



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115175693 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 11

(21) 申请号 202180015824.4

(22) 申请日 2021.01.15

(30) 优先权数据

62/962,763 2020.01.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/013727 2021.01.15

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/146620 EN 2021.07.22

(71) 申请人 田纳西大学研究基金会

地址 美国田纳西州

(72) 发明人 J·S·沃尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 49/16 (2006.01)

权利要求书2页 说明书61页

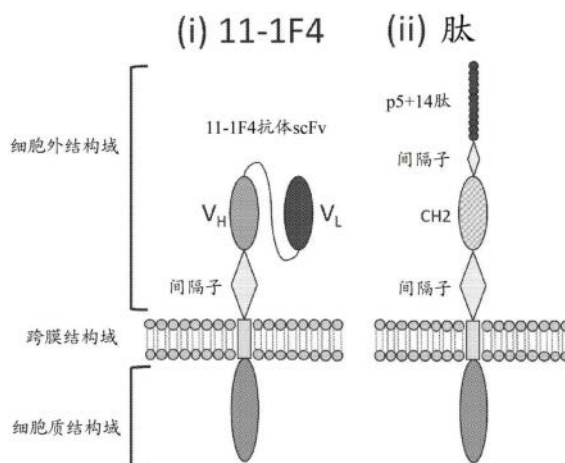
序列表31页 附图7页

(54) 发明名称

用于去除淀粉样蛋白的嵌合抗原受体

(57) 摘要

本文提供了包含淀粉样蛋白结合区的嵌合受体,以及包含所述嵌合受体的细胞。本文还提供了通过施用包含嵌合受体的细胞来治疗基于淀粉样蛋白的疾病的方法。



1. 一种嵌合受体,其包含:  
细胞质结构域,其中所述细胞质结构域包含受体的信号传导结构域,所述信号传导结构域在被活化时活化巨噬细胞;  
跨膜结构域;和  
细胞外结构域,其中所述细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区。
2. 如权利要求1所述的嵌合受体,其中所述细胞外结构域包含抗体或其功能片段。
3. 如权利要求2所述的嵌合受体,其中所述抗体片段是scFv。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的嵌合受体,其中所述抗体包含有包含CDRL1、CDRL2和CDRL3的VL和包含CDRH1、CDRH2和CDRH3的VH,其中所述  
CDRL1包含SEQ ID NO:24中列出的氨基酸序列;  
所述CDRL2包含SEQ ID NO:25中列出的氨基酸序列;  
所述CDRL3包含SEQ ID NO:26中列出的氨基酸序列;  
所述CDRH1包含SEQ ID NO:21中列出的氨基酸序列;  
所述CDRH2包含SEQ ID NO:22中列出的氨基酸序列;并且  
所述CDRH3包含SEQ ID NO:23中列出的氨基酸序列。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的嵌合受体,其中所述抗体包含有包含SEQ ID NO:19或34中列出的氨基酸序列的VL和包含SEQ ID NO:20或35中列出的氨基酸序列的VH。
6. 如权利要求1所述的嵌合受体,其中所述淀粉样蛋白结合区包含11-1F4抗体片段。
7. 如权利要求2-6中任一项所述的嵌合受体,其中所述抗体片段是人源化的。
8. 如权利要求1所述的嵌合受体,其中所述细胞外结构域包含淀粉样蛋白反应性肽。
9. 如权利要求8所述的嵌合受体,其中所述淀粉样蛋白反应性肽包含SEQ ID NO:1-18中列出的序列。
10. 如权利要求8或9所述的嵌合受体,其中所述淀粉样蛋白结合区直接或间接地连接至CH2结构域或其片段。
11. 如权利要求10所述的嵌合受体,其中所述CH2结构域包含与SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的嵌合受体,其中所述细胞质结构域包含细胞质结构域I、细胞质结构域II或其功能片段。
13. 如权利要求12所述的嵌合受体,其中所述细胞质结构域包含与SEQ ID NO:30、31、41、42或45中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。
14. 如权利要求1-12中任一项所述的嵌合受体,其中淀粉样蛋白与所述细胞外结构域的结合活化了所述嵌合受体的细胞质结构域。
15. 如权利要求1所述的嵌合受体,其中所述受体与SEQ ID NO:43中列出的序列具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性,具有或不具有分泌前导序列。
16. 如权利要求1所述的嵌合受体或如权利要求11-15中任一项所述的方法,其中所述受体的每个组分一起或单独地与SEQ ID NO:43的对应组分具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性。
17. 编码如权利要求1-16中任一项所述的嵌合受体的核酸。

18. 一种工程化细胞,其包含如权利要求17所述的核酸。

19. 一种用于去除淀粉样蛋白的方法,其包括使淀粉样蛋白沉积物与如权利要求1-16中任一项所述的嵌合受体或如权利要求18所述的工程化细胞接触。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述淀粉样蛋白是AA、AL、AH、ATTR、AB2M、野生型TTR、AApoAI、AApoAII、AGel、ALys、ALect2、Afib、ACys、ACal、AMedin、AIAPP、APro、AIns、APrP或A $\beta$ 。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述嵌合受体的淀粉样蛋白结合区对所述淀粉样蛋白具有结合亲和力。

22. 如权利要求19-21中任一项所述的方法,其中使所述淀粉样蛋白沉积物与所述嵌合受体接触导致所述淀粉样蛋白的至少部分清除。

23. 一种治疗患有淀粉样蛋白病症的受试者的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求1-16中任一项所述的嵌合受体或如权利要求18所述的工程化细胞。

24. 如权利要求23所述的方法,其中向所述受试者施用所述嵌合受体包括施用表达所述嵌合受体的巨噬细胞或单核细胞。

## 用于去除淀粉样蛋白的嵌合抗原受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年1月17日提交的美国临时申请号62/962,763 的优先权,所述临时申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 在ASCII文本文件上提交序列列表

[0004] 关于ASCII文本文件的以下提交的内容以引用的方式整体并入本文:序列列表的计算机可读形式(CRF)(文件名称:165992000540SEQLIST.TXT,记录日期:2021年1月15日,大小:54KB)。

### 技术领域

[0005] 本申请涉及可用于去除淀粉样蛋白或治疗淀粉样蛋白相关疾病的嵌合抗原受体。

### 背景技术

[0006] 淀粉样变性是一种破坏性病理学,其不仅与阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)的发展相关,而且与鲜为人知但类似地具有破坏性的病症(如免疫球蛋白轻链相关(AL)淀粉样变性)相关。(Dispenzieri, A., 等人, Blood Rev, 2012.26(4):第137-54页; Merlini, G., Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2017.2017(1):第1-12页)。AL患者在心脏、肝脏、脾脏、肾脏和外周神经中出现淀粉样蛋白,其导致器官功能障碍并且始终是致命的。系统性疾病中的淀粉样蛋白沉积物在免疫学上是惰性的——它们不会被免疫系统的吞噬细胞(巨噬细胞,“Mφ”)识别或清除,并且也不会引发抗体响应。在表现出显著心脏淀粉样变性的患者中,预后很差,且中位生存期为约9个月(Gertz, M.A., 等人, Blood, 1991.77(2):第257-62页; Grogan, M., A. 等人, Heart, 2017.103(14):第1065-1072页)。AL淀粉样变性的治疗一般涉及抗浆细胞化学疗法和免疫疗法以抑制浆细胞分泌淀粉样蛋白形成轻链蛋白。然而,清除现有的组织淀粉样蛋白现在已成为为这些患者开发的许多新型疗法的主要目标。

[0007] 此外,大约3%的50岁以上普通美国人口患有浆细胞病症,称为意义不明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)(Weiss, B.M., 等人, Blood, 2009.113(22):第5418-22页)。这种病症当伴随着浆细胞分泌单克隆免疫球蛋白轻链(LC)时,是破坏性且通常致命的疾患LC相关(AL)淀粉样变性的不祥前兆,其中高度有序的蛋白原纤维由LC或其片段组成,沉积在器官和组织(包括肝脏、心脏、肾脏、脾脏、肠和神经)的细胞外空间(Dispenzieri, A., 等人, Blood Rev, 2012.26(4):第137-54页; Merlini, G., Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2017. 2017(1):第1-12页; Wechalekar, A.D., 等人, Systemic amyloidosis. Lancet, 2015)。淀粉样蛋白原纤维与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和血清衍生蛋白(如血清淀粉样蛋白P组分(SAP))缔合而沉积,导致形成复杂的病理基质。尽管淀粉样蛋白是一种“非天然”蛋白质聚集体,但它是非免疫原性的,并且令人惊讶地在患者中对先天免疫系统的吞噬细胞的清除具有抗性。事实上,对源自尸检的材料的评价显示没有明确的免疫细胞流入。

[0008] 尽管对AL淀粉样变性的发病机制进行了数十年的研究,并提高了患者的存活率

(Dispenzieri, A., 等人, *Blood Rev*, 2012. 26 (4) : 第 137-54页), 但该疾病仍然始终是致命的。表现出严重心脏AL相关淀粉样变性的受试者的总生存期为约9个月(Grogan, M., A. 等人, *Heart*, 2017. 103 (14) : 第1065-1072页)。这是因为患者一般表现出显著的器官损害的组织淀粉样蛋白负荷并伴随不良预后, 特别是当心脏 (Kristen, A.V., 等人, *J Am Coll Cardiol*, 2016. 68 (1) : 第13-24页) 或肾脏 (Kuroda, T., 等人, *BMC Nephrol*, 2012. 13: 第118页) AL淀粉样变性是主要表现时 (Kristen, A.V., 等人, *J Am Coll Cardiol*, 2016. 68 (1) : 第13-24页; Banypersad, S.M., 等人, *Eur Heart J*, 2015. 36 (4) : 第 244-51页)。AL淀粉样变性患者的既定临床管理旨在预防促淀粉样蛋白生成前体LC蛋白的产生, 从而预防淀粉样蛋白负荷的扩大。这是通过使用浆细胞化学疗法和免疫疗法 (Chaulagain, C.P. 和 R.L. Comenzo, *Clin Adv Hematol Oncol*, 2015. 13 (5) : 第315-24页; Comenzo, R.L., 等人, *N Engl J Med*, 2008. 358 (1) : 第92页; 作者回复92-3; Sanchorawala, V., 等人, *Bone Marrow Transplant*, 2004. 33 (4) : 第 381-8页; Varga, C. 和 R.L. Comenzo, *Bone Marrow Transplant*, 2018)、蛋白酶体抑制剂 (Chaulagain, CP 和 R.L. Comenzo, *Clin Adv Hematol Oncol*, 2015. 13 (5) : 第315-24页; Sidiqi, M.H. 和 M.A. Gertz, *Leuk Lymphoma*, 2018: 第1-7页; Milani, P., 等人, *Kidney Int Rep*, 2018. 3 (3) : 第530-541页) 以及自体干细胞移植 (D'Souza, A., 等人, *J Clin Oncol*, 2015. 33 (32) : 第3741-9页) 来实现的。然而, 这些方法并非设计来促进现有组织淀粉样蛋白的主动溶解。尽管响应于这些方法, 血液学缓解成功, 但在大多数患者中, LC蛋白恢复并且疾病进展。在这些患者中, 组织中不断积累的淀粉样蛋白始终是有助于器官功能障碍、恶化的生活质量和死亡率的主要因素。

[0009] 已经使用至少两种淀粉样蛋白反应性结合蛋白证明了AL淀粉样蛋白的摄取: (1) mAb 11-1F4 (Hrncic, R., 等人, *Am J Pathol*, 2000. 157 (4) : 第1239-46页; Solomon, A., 等人, *Clin Cancer Res*, 2003. 9 (10 Pt 2) : 第3831S-8S页; Solomon, A., 等人, *Cancer Biother Radiopharm*, 2003. 18 (6) : 第853-60页; Wall, J.S., 等人, *Blood*, 2010. 116 (13) : 第 2241-4页) 和 (2) 肽p5+14 (Kennel, S.J., 等人, *Mol Imaging Biol*, 2016. 18 (4) : 第483-9页; Martin, E.B., 等人, *Sci Rep*, 2016. 6: 第22695页; Wall, J.S., 等人, *Molecules*, 2015. 20 (5) : 第7657-82页)。此外, 为了解决“淀粉样蛋白清除”疗法的需求, 在过去20年中已经开发了淀粉样蛋白反应性单克隆抗体 (mAb), 并且最近对三种试剂进行了临床试验 (Richards, D.B., 等人, *Sci Transl Med*, 2018. 10 (422); Edwards, C.V., 等人, *Amyloid*, 2017. 24 (增刊1) : 第58-59页; Gertz, M.A., 等人, *J Clin Oncol*, 2016. 34 (10) : 第1097-103页; Gertz, M.A., 等人, *Am J Hematol*, 2016. 91 (12) : 第E506-E508页; Wall, J.S., 等人, *Blood*, 2010. 116 (13) : 第2241-4页)。建议使用这些mAb进行被动免疫治疗的作用方式涉及特定的淀粉样蛋白结合和淀粉样蛋白的调理作用, 导致局部巨噬细胞 (**M $\phi$** ) 活化和淀粉样蛋白的吞噬作用 (Wall, J.S., 等人, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018. 115 (46) : 第E10839-E10848页)。此外, **M $\phi$**  的刺激是通过mAb Fc结构域与Fc受体 (FcR) 的相互作用或通过补体 C3受体用淀粉样蛋白结合的mAb进行补体固定后介导的 (Bodin, K., 等人, *Nature*, 2010. 468 (7320) : 第93-7页; Milde, R., 等人, *Cell Rep*, 2015. 13 (9) : 第1937-48页)。已进行临床评价的三种mAb中的两种, 即嵌合 (c) 11-1F4 和人源化NEOD001 mAb, 已产生或经历了临床前开发 (Hrncic, R., 等人, *Am J Pathol*, 2000. 157 (4) : 第1239-46页; Wall, J.S., 等人, *PLoS One*, 2012. 7 (12) : 第e52686页; Solomon, A., D.T. Weiss, 和 J.S. Wall, *Clin*

Cancer Res, 2003.9 (10Pt 2): 第3831S-8S页; O'Nuallain, B., 等人 Amyloid and Amyloidosis: Proceedings of the Xth International Symposium on Amyloidosis. 2005. Tours, France: CRC Press)。尽管1期试验有积极的临床数据, 但由于关键的3期试验 (NCT02312206) 的中期评价缺乏功效, NEOD001项目被终止, 并且 c11-1F4 2期试验已停滞。第三个单克隆抗体 (Glaxo-SmithKline; NCT03044353) 的1期试验产生的数据表明, 用迪扎米珠单抗 (dezamizumab) 治疗AL患者可能导致组织淀粉样蛋白的显著和可测量的清除 (Richards, D.B., 等人, Sci Transl Med, 2018.10 (422))。这项试验最近因有待公布的数据而停止。因此, 需要开发进一步的“淀粉样蛋白清除”疗法。尽管有这些mAb试验的总体结果, 但产生的数据支持AL淀粉样蛋白的调理作用可导致其溶解的假设。

[0010] 清除所关注的靶标的一种方法是施用表达对靶标具有特异性的嵌合抗原受体 (CAR) 的吞噬细胞。例如, 呈递包含CD19结合受体和细胞质促吞噬作用信号传导元件的嵌合抗原受体 (CAR) 的  $M\phi$  已被证明表现出对CD19包被的珠粒的摄取增强和对培养物中表达CD19的 B淋巴细胞的杀伤增强 (Morrissey, M.A., 等人, Elife, 2018.7)。具体地, 使用含有吞噬作用信号传导免疫受体的细胞质元件, 即基于酪氨酸的活化基序 (ITAM; 参见 Hamerman, J.A., 等人, Immunol Rev, 2009. 232 (1): 第42-58页; Swisher, J.F. and G.M. Feldman, Immunol Rev, 2015. 268 (1): 第160-74页) 的CAR显著增强了直径达20 $\mu$ m的CD19和 CD22包被的颗粒的摄取。此外, 在培养物中观察到CD19阳性Raji B 淋巴细胞的杀伤。这项研究的重点是结合肿瘤细胞抗原和肿瘤细胞杀伤, 并且还证明了几种独特的CAR构建体增强了吞噬作用, 同时显示出一些比其他更有效。

[0011] 总之, 在本领域中需要设计用于清除淀粉样蛋白沉积物的疗法。

## 发明内容

[0012] 本文提供了一种嵌合受体, 其包含: 细胞质结构域, 其中所述细胞质结构域包含受体的信号传导结构域, 所述信号传导结构域在被活化时活化巨噬细胞; 跨膜结构域; 和细胞外结构域, 其中所述细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区。

[0013] 在一些实施方案中, 其中细胞外结构域包含抗体或其功能片段。在一些实施方案中, 抗体片段是scFv。在一些实施方案中, 抗体包含有包含CDRL1、CDRL2和CDRL3的VL和包含CDRH1、CDRH2 和CDRH3的VH, 其中CDRL1包含SEQ ID NO: 24中列出的氨基酸序列; CDRL2包含SEQ ID NO: 25中列出的氨基酸序列; CDRL3包含SEQ ID NO: 26中列出的氨基酸序列; CDRH1包含SEQ ID NO: 21 中列出的氨基酸序列; CDRH2包含SEQ ID NO: 22中列出的氨基酸序列; CDRH3包含SEQ ID NO: 23中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中, 抗体包含有包含SEQ ID NO: 19或34中列出的氨基酸序列的VL和包含SEQ ID NO: 20或35中列出的氨基酸序列的VH。在一些实施方案中, 淀粉样蛋白结合区包含11-1F4抗体片段。在一些实施方案中, 抗体片段是人源化的。

[0014] 在一些实施方案中, 细胞外结构域包含淀粉样蛋白反应性肽。在一些实施方案中, 淀粉样蛋白反应性肽包含SEQ ID NO: 1-18中列出的序列。

[0015] 在一些实施方案中, 淀粉样蛋白结合区直接或间接地连接至CH2 结构域或其片段。在一些实施方案中, CH2结构域包含与SEQ ID NO: 33中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,细胞质结构域包含细胞质结构域I、细胞质结构域II或其功能片段。在一些实施方案中,细胞质结构域包含与 SEQ ID NO:30、31、41、42或45中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白与细胞外结构域的结合活化了嵌合受体的细胞质结构域。

[0018] 在一些实施方案中,嵌合受体与SEQ ID NO:43中列出的序列具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性,具有或不具有分泌前导序列。在一些实施方案中,受体的每个组分一起或单独地与SEQ ID NO:43的对应组分具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性。

[0019] 本文还提供了编码本文提供的嵌合受体的核酸。

[0020] 在一些实施方案中,本文提供了工程化细胞,其包含编码本文提供的嵌合受体的核酸。

[0021] 在一些实施方案中,本文提供了一种用于去除淀粉样蛋白的方法,其包括使淀粉样蛋白沉积物与本文提供的嵌合受体或包含本文提供的嵌合受体的工程化细胞接触。在一些实施方案中,淀粉样蛋白是AA、AL、AH、ATTR、Aβ2M、野生型TTR、AApoAI、AApoAII、AGel、ALys、ALect2、Afib、ACys、ACal、AMedin、AIAPP、APro、AIns、APrP或Aβ。

[0022] 在一些实施方案中,嵌合受体的淀粉样蛋白结合区对淀粉样蛋白具有结合亲和力。

[0023] 在一些实施方案中,使淀粉样蛋白沉积物与嵌合受体接触导致淀粉样蛋白的至少部分清除。

[0024] 本文还提供了治疗患有淀粉样蛋白病症的受试者的方法,其包括向所述受试者施用本文提供的嵌合受体或本文提供的工程化细胞。在一些实施方案中,向受试者施用嵌合受体包括施用表达所述嵌合受体的巨噬细胞或单核细胞。

## 附图说明

[0025] 图1示出了基于11-1F4 scFv(左,标记为“(i) 11-1F4”)和基于 p5+14肽(右,标记为“(ii) 肽”)的淀粉样蛋白特异性CAR结构的示意图。在左侧,基于11-1F4的CAR从N端到C端包含细胞外结构域(由 11-1F4抗体scFv(包括VL(表示为深灰色椭圆形)、scFv接头(连接VL和VH的线),以及VH(中灰色椭圆形)、间隔序列(菱形)组成)、跨膜结构域(矩形)和细胞质结构域(较大的中灰色椭圆形)。在右侧,基于肽的CAR从N端到C端包含细胞外结构域(由p5+14肽、第一间隔子序列(较小的菱形)、CH2结构域(棋盘椭圆形)、第二间隔子序列(较大的菱形)组成)、跨膜结构域(矩形)和细胞质结构域(较大的中灰色椭圆形)。

[0026] 图2示出了在单克隆抗体即将输注前(左)和单克隆抗体输注后第42天(右)的全身前部<sup>123</sup>I-SAP显像。观察到肝淀粉样蛋白负荷明显降低。来自Richards等人(Sci Transl Med, 2018 10(422))。

[0027] 图3示出了嵌合抗原受体特征的示意图。

[0028] 图4A-图4D示出了评价m11-1F4的体内施用的实验结果。图4A 示出了通过使用<sup>125</sup>I-m11-1F4的SPECT/CT图像检测到的小鼠皮下植入(箭头)的人AL淀粉样蛋白提取物。图4B示出了用m11-1F4治疗携带皮下人AL淀粉样蛋白(箭头)的小鼠导致病变消退。图4C示出

了对照治疗的动物。图4D通过PET/CT成像示出了<sup>124</sup>I-m11-1F4在 AL淀粉样变性患者中的生物分布。箭头是在增大的、淀粉样蛋白负荷的肝脏中摄取mAb。

[0029] 图5A-图5B在组织切片中示出了显示肽p5+14结合人AL淀粉样蛋白的结果。图5A示出了当放射性碘化时,看到<sup>124</sup>I-p5+14与AL 淀粉样变性患者中可能含有淀粉样蛋白的器官(肾、脾和胰腺)的共定位。图5B示出了患者的PET/CT成像。

[0030] 图6示出了建议的基于11-1F4 scFv(左,标记为“(i) 11-1F4”)和基于p5+14肽(右,标记为“(ii) 肽”)的CAR结构的示意图。

## 具体实施方式

### [0031] I. 定义

[0032] 除非另有说明,否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义可见于Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones and Bartlet, 2008 (ISBN 0763752223); Kendrew等人(编), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0632021829) 和Robert A. Meyers(编), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 9780471185710) 以及其他相似参考文献。如本文所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”是指单数以及复数两者,除非上下文另外清楚地指明。缩写“例如(e.g.)”源自拉丁文的例如(exempli gratia),并且在本文中用于指示非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。如本文所用,术语“包含”意指“包括”。

[0033] 范围在本文中可表示为从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。当表述这种范围时,另一个方面包括从范围的一个特定值和/或至范围的另一个特定值。将进一步理解,所述范围的每个端点相对于另一个端点以及独立于另一个端点都是有意义的。类似地,当值表述为近似值时,通过使用先行词“约”,将理解特定值形成另一个方面。在某些示例性实施方案中,术语“约”被理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。约可理解为在所陈述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%以内。除非从上下文显而易见,否则本文提供的所有数值都可用术语约来修饰。此外,本文使用的术语,如“实例(example)”、“示例性(exemplary)”或“例示(exemplified)”并不意味着显示偏好,而是解释此后论述的方面仅仅是所呈现的方面的一个实例。

[0034] 还应理解,针对核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值都是近似值,并且提供用于描述。尽管与本文描述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料可于本公开的实践或测试中,但以下描述合适的方法和材料。在冲突的情况下,将以本说明书(包括术语的解释)为准。此外,材料、方法和实例仅是说明性的而不意图是限制性的。

[0035] 为了便于审查本公开的各种实施方案,提供对特定术语的以下解释:

[0036] 施用:通过选定途径将组合物引入受试者中。例如,如果选定途径是静脉内的,则通过将组合物引入受试者的静脉中来施用组合物。在一些实例中,将肽施用于受试者。

[0037] 术语淀粉样蛋白、淀粉样蛋白沉积物、淀粉样蛋白原纤维和淀粉样蛋白纤维是指

具有特定结构特征的不溶性纤维状蛋白质聚集体。蛋白质聚集体具有例如由几种不同蛋白质中的任一种的聚集形成并且由垂直于纤维轴堆叠的有序排列的 $\beta$ 折叠组成的三级结构。参见Sunde等人, *J.Mol.Biol.* (1997) 273:729-39。淀粉样蛋白在器官中的异常累积可能导致淀粉样变性。尽管它们的出现多种多样,但所有淀粉样蛋白都具有共同的形态学性质,在于它们被如刚果红的特定染料染色,并且在染色后在偏振光下具有特征性的红绿色双折射外观。淀粉样蛋白还具有共同的超微结构特征和共同的x射线衍射和红外光谱。

[0038] 淀粉样变性是指以淀粉样蛋白的存在,如淀粉样蛋白沉积物的存在为特征的病理性疾患或疾病。“淀粉样蛋白病”或“淀粉样变性”是与淀粉样蛋白原纤维的形成、沉积、累积或持续存在相关的疾病。此类疾病包括但不限于阿尔茨海默氏病、唐氏综合症、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变性和脑 $\beta$ -淀粉样血管病。其他淀粉样蛋白病如系统性AA淀粉样变性、AL淀粉样变性、ATTR淀粉样变性、ALect2淀粉样变性以及II型糖尿病的IAPP淀粉样变性也是淀粉样蛋白病。

[0039] 淀粉样蛋白生成是指产生或倾向于产生淀粉样蛋白沉积物。例如,某些可溶性单体蛋白可经历广泛构象变化,从而导致它们聚集成良序、无分支的8-10-nm宽的原纤维,所述原纤维最终形成淀粉样蛋白聚集体。例如,已发现超过三十种蛋白质在人体中形成淀粉样蛋白沉积物(或淀粉样蛋白)。并非不同蛋白质类别(如免疫球蛋白轻链)中的所有蛋白质都能够形成淀粉样蛋白,即,一些蛋白质是非淀粉样蛋白生成性的,这意味着它们不倾向于形成淀粉样蛋白。然而,所述类别的其他蛋白质可形成淀粉样蛋白沉积物,并且因此是淀粉样蛋白生成性的。此外,在轻链蛋白质类别中,基于它们形成淀粉样蛋白原纤维的难易程度,一些蛋白质可能被认为比蛋白质更具“淀粉样蛋白生成性”。某些轻链蛋白质被认为是非淀粉样蛋白生成性的或较少淀粉样蛋白生成性的,因为它们不能在患者体内或在体外容易地形成淀粉样蛋白原纤维。

[0040] 动物:活的多细胞脊椎动物生物体,包括例如哺乳动物和鸟类的一种类别。术语哺乳动物包括人和非人哺乳动物。类似地,术语“受试者”包括人受试者和兽医受试者。在一些实例中,受试者是受试者,如患有淀粉样蛋白病的受试者。

[0041] 清除:术语“清除(clear)”或“清除(clearance)”是指减少或去除可测量的程度。例如,如本文所述的淀粉样蛋白沉积物的清除涉及将沉积物减少或去除至可测量或可辨别的程度。清除可导致100%去除,但不是必需的。相反,清除可导致小于100%去除,如约10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多去除。

[0042] 抗体是指属于多克隆、单克隆、嵌合和异源免疫球蛋白类别的单链、双链和多链蛋白质和糖蛋白(优选单克隆抗体);它还包括这些免疫球蛋白的合成和遗传工程化的变体。“抗体片段”包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv和Fv片段,以及对一个或多个所需靶表位具有特异性的抗体的任何部分。“单克隆抗体”是由单个B淋巴细胞克隆产生的抗体。通过本领域技术人员已知的方法产生单克隆抗体,例如通过从骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合物制备杂合抗体形成细胞。

[0043] 表位是指如由抗体氨基酸序列的特异性所确定,由抗体识别的抗原上的位点。表位也被称为抗原决定簇。例如,表位可以是由特定抗体识别的重组蛋白的一部分。此外,表位可以是构象表位和线性表位。

[0044] 嵌合抗体是指包含源自两种不同抗体的序列的抗体,所述两种抗体通常属于不同

的物种。最通常地,嵌合抗体包括人和鼠抗体片段,一般是人恒定区和鼠可变区。

[0045] 人源化抗体是指源自非人抗体,通常是鼠的抗体,以及保留或基本上保留亲本抗体的抗原结合特性但在人中免疫原性较低的人抗体。

[0046] 互补决定区或CDR是指共同定义天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各自具有三个CDR,分别命名为L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3 和H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3。根据定义,轻链的CDR由位置24 和34(L-CDR1)、50和56(L-CDR2)、89和97(L-CDR3)处的残基界定;重链的CDR由位置31和35b(H-CDR1)、50和65(H-CDR2)、95和102(H-CDR3)处的残基界定,使用Kabat等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Department of Health and Human Services,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda(NIH出版号91-3242)描述的编号惯例。

[0047] 框架区是指插入在CDR之间的氨基酸序列。抗体的这些部分用于将CDR保持在用于抗原结合的适当取向。

[0048] 有效量或治疗有效量:足以预防、治疗(包括预防)、减轻和/或改善(例如预防、抑制)任何病症或疾病的症状和/或根本原因和/或淀粉样变性的剂的量。在一些实施方案中,“有效量”足以减轻或消除疾病的症状。有效量可施用一次或多次。

[0049] 表达控制序列:调控与其可操作地连接的异源核酸序列的表达的核酸序列。当表达控制序列控制并调控核酸序列的转录和(在适当情况下)翻译时,所述表达控制序列可操作地连接至核酸序列。因此,表达控制序列可包括适当启动子、增强子、转录终止子、蛋白质编码基因前方的起始密码子(ATG)、内含子剪接信号、维持所述基因的正确阅读框以允许mRNA的适当翻译以及终止密码子。术语“控制序列”意图至少包括其存在可影响表达的组分,并且还可包括其存在是有利的另外组分,例如前导序列和融合配偶体序列。表达控制序列可包括启动子。

[0050] 启动子是足以指导转录的最小序列。还包括足以使启动子依赖性基因表达对于细胞类型特异性、组织特异性而言可控制或可被外部信号或剂诱导的那些启动子元件;此类元件可位于基因的5'或3'区域。包括组成型和诱导型启动子(参见例如,Bitter等人,Methods in Enzymology 153:516-544,1987)。例如,当在细菌系统中克隆时,可使用诱导型启动子,如噬菌体λ的pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂合启动子)等。在一个实施方案中,当在哺乳动物细胞系统中克隆时,可使用源自哺乳动物细胞的基因组的启动子(如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(如逆转录病毒长末端重复序列;腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。通过重组DNA或合成技术产生的启动子也可用于提供核酸序列的转录。可将多核苷酸插入到含有启动子序列的表达载体中,所述启动子序列有助于宿主的插入基因序列的有效转录。表达载体通常含有复制起点、启动子以及允许对转化细胞进行表型选择的特定核酸序列。

[0051] 抑制:减少可测量的程度。例如,抑制不需要完全丧失功能或完全停止被测量的方面。例如,抑制斑块形成可意味着终止斑块的进一步生长、减缓斑块的进一步生长或减小斑块的大小。

[0052] 抑制或治疗疾病:抑制疾病或疾患的全面发展,例如抑制淀粉样变性。“治疗”是指在疾病或病理性疾患开始发展后改善其体征或症状的治疗性干预。关于疾病或病理性疾患

的术语“改善”是指治疗的任何可观察到的有益效果。有益效果可通过例如在易感受试者中疾病的临床症状的延迟发作、疾病的一些或所有临床症状的严重程度降低、疾病的较慢进展、受试者的总体健康或福祉的改善或本领域众所周知的特定疾病所特有的其他参数来证明。“预防性”治疗是向未表现出疾病的体征或仅表现出早期体征的受试者施用治疗，目的是降低发展病理的风险。

[0053] 关于淀粉样蛋白沉积物形成，“抑制”是指防止淀粉样蛋白沉积物的形成减少，如当与对照相比时。例如，与对照相比，抑制可导致淀粉样蛋白沉积物减少约10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多。

[0054] 分离的：“分离的”生物组分，如肽、细胞、核酸或血清样品已经与所述组分天然存在于其中的生物体的细胞中的其他生物组分（例如，其他染色体和染色体外DNA和RNA以及蛋白质）基本上分离、除了所述其他生物组分以外产生或从所述其他生物组分中纯化出来。因此，已“分离”的核酸、肽和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。术语还包括通过在细胞中重组表达制备的核酸、肽和蛋白质以及化学合成的肽和核酸。术语“分离的”或“纯化的”不需要绝对纯度；相反，它旨在作为相对术语。因此，例如，分离的肽制剂是其中肽或蛋白质比所述肽或蛋白质在其细胞内的天然环境中更富集的一种肽制剂。优选地，对制剂进行纯化，使得蛋白质或肽占所述制剂的总肽或蛋白质含量的至少50%，如肽或蛋白质浓度的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或甚至至少99%。

[0055] 连接：如本文所用，术语“连接 (join)”、“连接的 (joined)”、“连接 (link)”或“连接的 (linked)”是指本领域已知的用于功能性地连接蛋白质和/或蛋白质结构域的任何方法。例如，一个蛋白质结构域可通过共价键连接至另一个蛋白质结构域，如在重组融合蛋白中，有或没有插入序列或结构域。连接还包括例如将两个序列整合在一起，如将两个核酸序列一起放置在同一核酸链中，使得序列一起表达。

[0056] 核酸：由通过磷酸二酯键连接的核苷酸单元（核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、相关的天然存在的结构变体和合成的非天然存在的其类似物）、其相关的天然存在的结构变体和合成的非天然存在的其类似物组成的聚合物。因此，该术语包括核苷酸聚合物，其中核苷酸和它们之间的键联包括非天然存在的合成类似物，例如像但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、膦酸甲酯、手性膦酸甲酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽核酸 (PNA) 等。此类多核苷酸可例如使用自动化DNA合成仪来合成。术语“寡核苷酸”通常是指短多核苷酸，通常不超过约50个核苷酸。应理解，当核苷酸序列由DNA序列（即A、T、G、C）表示时，这也包括其中“U”替代“T”的RNA序列（即A、U、G、C）。

[0057] 核苷酸包括但不限于单体，所述单体包含与糖连接的碱基，如嘧啶、嘌呤或其合成类似物，或与氨基酸连接的碱基，如在肽核酸 (PNA) 中。核苷酸是多核苷酸中的一个单体。核苷酸序列是指多核苷酸中的碱基的序列。

[0058] 本文中使用常规符号来描述核苷酸序列：单链核苷酸序列的左端是5'-端；将双链核苷酸序列的左侧方向称为5'-方向。将核苷酸的5'至3'添加至新生RNA转录物的方向被称为转录方向。与mRNA具有相同序列的DNA链被称为“编码链”；在具有与从DNA转录的mRNA相同的序列的所述DNA链上并且位于RNA转录物的5'至5'端的序列被称为“上游序列”；在具有与RNA相同的序列的DNA链上并且是编码RNA转录物的3'至3'端的序列被称为“下游序

列”。

[0059] cDNA是指以单链或双链形式与mRNA互补或相同的DNA。

[0060] 编码是指多核苷酸(如基因、cDNA或mRNA)中的核苷酸的特定序列充当在生物学过程中合成具有限定的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列的其他聚合物和大分子的模板的固有特性和由此产生的生物学特性。因此,如果由所述基因产生的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生所述蛋白质,则基因编码蛋白质。其核苷酸序列与mRNA序列相同且通常在序列表中提供的编码链,以及用作基因或cDNA的转录模板的非编码链都可被称为编码所述基因或cDNA的蛋白质或其他产物。除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括为彼此的简并型式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可包含内含子。

[0061] 重组核酸是指具有非天然连接在一起的核苷酸序列的核酸。这包括包含可用于转化合适宿主细胞的扩增或组装的核酸的核酸载体,如腺病毒载体。包含重组核酸的宿主细胞被称为“重组宿主细胞”。然后在重组宿主细胞中表达基因以产生如“重组多肽”。重组核酸也可起到非编码功能(如启动子、复制起点、核糖体结合位点等)的作用。如果序列为第一序列的多核苷酸与序列为第二序列的多核苷酸特异性地杂交,则所述第一序列相对于所述第二序列是“反义的”。

[0062] 药学上可接受的载体:使用的药学上可接受的载体是常规的。由E.W.Martin所著的Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,PA,第19版(1995)描述适于药物递送本文公开的融合蛋白的组合物和制剂。

[0063] 一般来说,载体的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射流体,所述可注射流体包含药学上和生理学上可接受的流体,如水、生理盐水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、甘油等作为媒介物。对于固体组合物(例如粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载剂可包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物中性载剂之外,待施用的药物组合物还可含有少量无毒辅助物质,如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0064] 多肽:其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。当氨基酸是 $\alpha$ -氨基酸时,可使用L-旋光异构体或D-旋光异构体,优选L-异构体。如本文所用,术语“多肽”或“蛋白质”意图涵盖任何氨基酸序列并且包括经修饰的序列,如糖蛋白。术语“多肽”专门意图涵盖天然存在的蛋白质,以及重组或合成产生的那些蛋白质。在一些实例中,肽是本文公开的一种或多种肽。

[0065] 纯化的:术语“纯化的”不需要绝对纯度;相反,它意图作为相对术语。因此,例如,纯化的蛋白质制剂是其中所提及的蛋白质比细胞内或生产反应室(在适当情况下)内其天然环境中的蛋白质更纯的蛋白质制剂。

[0066] 重组:重组核酸是具有非天然存在的序列或具有通过两个否则分离的序列区段的人工组合而制成的序列的核酸。这种人工组合通常通过化学合成或更常见地通过人工操作分离的核酸区段来完成,例如通过遗传工程化技术。

[0067] 序列同一性:两个核酸序列或两个氨基酸序列之间的相似性以序列之间的相似性来表示,也称为序列同一性。序列同一性通常以同一性(或相似性或同源性)百分比来衡量;百分比越高,两个序列越相似。

[0068] 比对用于比较的序列的方法是本领域中众所周知的。各种程序和比对算法描述于:Smith和Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman和Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson和Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins和Sharp *Gene* 73: 237-244, 1988; Higgins和Sharp *CABIOS* 5:151-153, 1989; Corpet等人 *Nuc. Acids Res.* 16, 10881-90, 1988; Huang等人 *Computer Appls. In the Biosciences* 8, 155-65, 1992; 以及Pearson等人 *Meth. Mol. Bio.* 24, 307-31, 1994。Altschul等人 (*J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990) 提出了对序列比对方法和同源性计算的详细考虑。

[0069] NCBI基本局部比对搜索工具 (BLAST) (Altschul等人 *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990) 可自若干来源, 包括国家生物信息中心 (NCBI, Bethesda, MD) 和在因特网上获得以与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。

[0070] 可操作地连接: 当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时, 所述第一核酸序列与所述第二核酸序列可操作地连接。例如, 如果启动子影响编码序列的转录或表达, 则启动子与编码序列可操作地连接。一般来说, 可操作地连接的DNA序列是连续的, 并且在必要时在同一阅读框中连接两个蛋白质编码区。

[0071] 药剂: 当适当地施用于受试者或细胞时能够诱导所需的治疗或预防效果的化学化合物或组合物。

[0072] 载体: 引入宿主细胞中、从而产生转化的宿主细胞的核酸分子。重组DNA载体是具有重组DNA的载体。载体可包含允许其在宿主细胞中复制的核酸序列, 如复制起点。载体还可包含本领域已知的一种或多种选择性标记基因和其他遗传元件。病毒载体是具有源自一种或多种病毒的至少一些核酸序列的重组DNA载体。术语载体包括质粒、线性核酸分子, 并且如在整个腺病毒载体和腺病毒中所描述的。

[0073] 受试者是指脊椎动物。脊椎动物可以是哺乳动物, 例如人。受试者可以是人患者。受试者可以是患有或疑似患有疾病或疾患的患者, 并且可能需要治疗或诊断或者可能需要监测疾病或疾患的进展。患者也可能正在接受需要监测功效的治疗疗法。在一些示例性实施方案中, 受试者包括患有淀粉样变性如阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病或朊病毒病或如在患有轻链 (AL) 淀粉样变性和2型糖尿病的患者中所见的外周淀粉样变性的受试者。

[0074] 术语治疗 (treating) 或治疗 (treatment) 是指在疾病或病理性疾患开始发展后改善其体征或症状的治疗性干预。关于疾病或病理性疾患的术语“改善”是指治疗的任何可观察到的有益效果。有益效果可通过例如在易感受试者中疾病的临床症状的延迟发作、疾病的一些或所有临床症状的严重程度降低、疾病的较慢进展、受试者的总体健康或福祉的改善或本领域众所周知的特定疾病所特有的其他参数来证明。“预防性”治疗是向未表现出疾病的迹象或仅表现出早期迹象的受试者施用治疗, 目的是降低发展病理的风险。

[0075] 优选地, 不同一的残基位置因保守氨基酸取代而不同。术语“保守氨基酸取代”是指具有相似侧链的残基的可互换性。例如, 具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸; 具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸; 具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺; 具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸; 具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸; 并且具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组为: 缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸及天

冬酰胺-谷氨酰胺。

[0076] 如本文所论述,抗原受体的氨基酸序列中的微小变化被考虑涵盖在本发明中,条件是氨基酸序列中的变化保持至少75%,更优选至少80%、90%、95%且最优选99%。特别地,考虑保守氨基酸置换。保守置换是在它们的侧链中相关的氨基酸的家族内发生的那些置换。遗传编码的氨基酸一般分成以下家族:(1)酸性氨基酸是天冬氨酸、谷氨酸;(2)碱性氨基酸是赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性氨基酸是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;以及(4)不带电荷的极性氨基酸是甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸以及苏氨酸。疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸以及缬氨酸。其他氨基酸家族包括(i)丝氨酸和苏氨酸,它们是脂肪族-羟基家族;(ii)天冬酰胺和谷氨酰胺,它们是含有酰胺的家族;(iii)丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,它们是脂族家族;以及(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,它们是芳香族家族。例如,合理地预期用异亮氨酸或缬氨酸分离置换亮氨酸、用谷氨酸分离置换天冬氨酸、用丝氨酸分离置换苏氨酸或用结构上相关的氨基酸类似地置换氨基酸将不会对所得分子的结合或性质具有重大影响,特别是在置换不涉及框架位点内的氨基酸的情况下。氨基酸改变是否产生功能性肽可通过测定多肽衍生物的特异性活性容易地确定。测定在本文中详细描述。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可由本领域的普通技术人员容易地制备。片段或类似物的优选氨基和羧基末端出现在功能结构域的边界附近。可通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公开或专有序列数据库进行比较来鉴定结构性和功能性结构域。优选地,计算机化的比较方法用于鉴定在具有已知结构和/或功能的其他蛋白质中出现的序列基序或预测的蛋白质构象结构域。用于鉴定折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。(Bowie等人Science 253:164 (1991)。因此,前述实例证明,根据本发明,本领域的技术人员可识别可用于定义结构性和功能性结构域的序列基序和结构构象。

[0077] 优选的氨基酸取代是以下取代:(1)降低对蛋白水解的敏感性,(2)降低对氧化的敏感性,(3)改变用于形成蛋白质复合物的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,以及(4)赋予或改变此类类似物的其他物理化学或功能性质。类似物可包括除天然存在的肽序列以外的序列的各种突变蛋白。例如,单个或多个氨基酸取代(优选保守氨基酸取代)可在天然存在的序列中进行(优选在形成分子间接触的一个或多个结构域外部的多肽部分中进行)。保守性氨基酸取代不应实质上改变亲本序列的结构特征(例如,置换氨基酸不应倾向于打断亲本序列中存在的螺旋,或破坏表征亲本序列的其他类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级结构和三级结构的实例描述于Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, 编, W.H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden和J. Tooze 编, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 和Thornton等人 Nature 354:105 (1991)中。

[0078] “框架”或“FR”是指除CDR残基以外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,CDR和FR序列通常在VH(或VL)中按以下序列出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4;或FR1-CDR-H1(L1)-FR2-CDR-H2(L2)-FR3-CDR3-H3(L3)-FR4。

[0079] II. 结合淀粉样蛋白的嵌合受体

[0080] 鉴于目前可用于AL淀粉样变性患者的治疗选择不足,临床迫切需要有效去除组织淀粉样蛋白的替代方法。因此,本公开部分基于嵌合抗原受体吞噬(CAR-P)巨噬细胞(“Mφ”)的构建体的设计(Morrissey, M.A., 等人, *Elife*, 2018.7), 仿照CAR-T淋巴细胞抗肿瘤技术。在一些实施方案中,嵌合抗原受体是模块化的、合成的、单链蛋白,其包含三个功能区:(i) 结合受体(细胞外结构域);(ii) 间隔子和跨膜区,和;(iii) 细胞质信号传导结构域(细胞内)(Zhang, C., 等人, *Biomark Res*, 2017.5: 第22页)。在一些实施方案中,可切割的前导肽或信号肽被置于蛋白质的N端以定向通过内质网的通道并促进在质膜上的展示(参见例如图3)。每个“模块”可以衍生自蛋白质,以实现特定的靶标结合和所需的细胞响应,通过细胞质信号传导结构域,例如CD3 $\zeta$ 结构域(Daniyan, A.F. 和R.J. Brentjens, *J Leukoc Biol*, 2016.100(6): 第1255-1264页;Oluwole, O.O. 和M.L. Davila, *J Leukoc Biol*, 2016.100(6): 第1265-1272页)引发。一般来说,细胞表面表达的嵌合受体与适当靶标的结合导致CAR呈递细胞的聚集和活化。

[0081] 如本文详细描述,嵌合受体(例如,嵌合抗原受体,或“CAR”)构建体被设计用于特异性识别和促进淀粉样蛋白,如AL淀粉样蛋白的吞噬作用。构建体可以在巨噬细胞中表达。如在实施例所述,CAR 被设计为掺入淀粉样蛋白反应性单链可变片段(scFv)或淀粉样蛋白反应性合成肽作为靶结合受体(参见例如图1和图6;Wall, J.S., 等人, *Molecules*, 2015.20(5): 第7657-82页;Wall, J.S., 等人., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018.115(46): 第E10839-E10848页)。据信,淀粉样蛋白是用于这种方法的一个优异的和未开发的靶标,鉴于淀粉样蛋白是一种破坏性的无细胞病理,并且因此缺乏与肿瘤细胞相关的“不要吃我”蛋白质(例如CD47(参见Gu, S., 等人, *J Immunol Res*, 2018.2018: 第6156757页;Russ, A., 等人, *Blood Rev*, 2018.32(6): 第480-489页; Tong, B. 和M.Wang, *Future Oncol*, 2018.14(21): 第2179-2188页)和MHC I类(参见Barkal, A.A., 等人, *Nat Immunol*, 2018.19(1): 第76-84 页)。此外,淀粉样蛋白很容易从脉管系统中获得。

[0082] 本文提供了结合淀粉样蛋白(例如,人淀粉样蛋白原纤维)的嵌合受体。在一些实施方案中,所述嵌合受体包含:细胞质结构域,其中所述细胞质结构域包含受体的信号传导结构域,所述信号传导结构域在被活化时活化吞噬细胞(例如,巨噬细胞);跨膜结构域;和细胞外结构域,其中所述细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区。

[0083] A. 包含淀粉样蛋白结合区的细胞外结构域

[0084] 本文提供了包含细胞外结构域的嵌合受体。在一些实施方案中,细胞外结构域包含与人淀粉样蛋白原纤维的区域(如表位)相互作用或结合的区域。在一些实施方案中,本文所述的淀粉样蛋白结合区结合至淀粉样蛋白沉积物或原纤维(例如,人淀粉样蛋白沉积物或原纤维)。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区结合至淀粉样蛋白中的一种或多种淀粉样蛋白生成性肽。在一些实施方案中,由淀粉样蛋白结合区结合的淀粉样蛋白包括淀粉样蛋白生成性 $\lambda$ 6可变结构域蛋白(V $\lambda$ 6W1)或淀粉样蛋白生成性免疫球蛋白轻链(AL)、 $\text{A}\beta$ (1-40)淀粉样蛋白样原纤维或淀粉样蛋白生成性 $\text{A}\beta$ 前体蛋白或血清淀粉样蛋白蛋白质A(AA)。在其他实施方案中,由淀粉样蛋白结合区结合的淀粉样蛋白包括以下的淀粉样蛋白生成性形式:免疫球蛋白重链(AH)、 $\beta_2$ -微球蛋白( $\text{A}\beta_2\text{M}$ )、甲状腺素运载蛋白变体(ATTR)、载脂蛋白AI(AApoAI)、载脂蛋白AII(AApoAII)、凝溶胶蛋白(AGe1)、溶菌酶(ALys)、白细胞

趋化因子 (ALect2)、纤维蛋白原 $\alpha$ 变体 (AFib)、胱抑素变体 (ACys)、降血钙素 ((ACal)、乳凝集素 (AMed)、胰岛淀粉样蛋白多肽 (AIAPP))、催乳素 (APro)、胰岛素 (AIns)、朊蛋白 (APrP);  $\alpha$ -突触核蛋白 (A $\alpha$ Syn)、tau (ATau)、心房利钠因子 (AANF) 或 IAAP、AL $\kappa$ 4、A1 $\lambda$ 1 其他淀粉样蛋白生成性肽。由淀粉样蛋白结合区结合的淀粉样蛋白生成性肽可以是蛋白质、蛋白质片段或蛋白质结构域。在一些实施方案中,淀粉样蛋白沉积物或淀粉样蛋白原纤维包含重组淀粉样蛋白生成性蛋白质。在一些实施方案中,淀粉样蛋白是疾病病理学的一部分。

[0085] 1. 包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段的淀粉样蛋白结合区

[0086] 本文提供了包含有包含淀粉样蛋白结合区的细胞外结构域的嵌合受体。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含如表A 中列出的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含P5、P5R、P5G、P8、P9、P19、P20、P31、P37、P39、P42、P43、P44、P48、P50、P58、P5+14或p5R+14 的氨基酸序列,如表A中所示。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽是P5、P5R、P5G、P8、P9、P19、P20、P31、P37、P39、P42、P43、P44、P48、P50、P58、P5+14或p5R+14,如表A中所示。不希望受任何特定理论的束缚,据信淀粉样蛋白结合肽或其功能片段将嵌合受体靶向淀粉样蛋白沉积物。

[0087] 表A. 淀粉样蛋白结合肽序列实例

肽	主要序列:	SEQ ID NO:
<b>P5</b>	KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q	SEQ ID NO:1
<b>P5R</b>	RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR Q	SEQ ID NO:2
<b>P5G</b>	GAQGA QAGQA GQAQG AQGAQ AGQAG Q	SEQ ID NO:3
<b>P8</b>	KAKAK AKAKA KAKAK	SEQ ID NO:4
<b>P9</b>	KAQAK AQAQA QAKAQ AKAQA KAQAK AQAQ	SEQ ID NO:5
<b>P19</b>	KAQQA QAKQA QQAQK AQQAQ AKQAA Q	SEQ ID NO:6
<b>P20</b>	QAQKA QAQQA KQAQQ AQKAQ AQQAK Q	SEQ ID NO:7
<b>P31</b>	KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q	SEQ ID NO:8
<b>P37</b>	KTVKT VTKVT KVTVK TVKTV TKVTK V	SEQ ID NO:9
<b>P39</b>	[KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q] <sub>D</sub>	SEQ ID NO:10
<b>P42</b>	V[Y] <sub>D</sub> KVK TKVKT KVKTK VKT	SEQ ID NO:11
<b>P43</b>	[AQA] <sub>D</sub> YS KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q	SEQ ID NO:12
<b>P44</b>	[AQA] <sub>D</sub> YA RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR Q	SEQ ID NO:13
<b>P48</b>	AQA[YS KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q] <sub>D</sub>	SEQ ID NO:14
<b>P50</b>	AQAYS KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q	SEQ ID NO:15
<b>P58</b>	AQA[Y] <sub>D</sub> S KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK Q	SEQ ID NO:16
<b>P5+14</b>	KAQKA QAKQA KQAQK AQKAQ AKQAK QAQKA QKAQA KQAKQ	SEQ ID NO:17
<b>p5R+14</b>	RAQRA QARQA RQAQR AQRAQ ARQAR QAQRA QRAQA RQARQ	SEQ ID NO:18

[0088]

[0090] 其中D=“D型”对映异构体。

[0091] 在一些实施方案中,本文所述嵌合受体的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与如SEQ ID NO:1-18中任一种列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或更多同一性的氨基酸序列,如与如SEQ ID NO: 1-18中任一种列出的氨基酸序列具有至少95%、至少

96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含以下或由以下组成:约10至约55个氨基酸。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含以下或由以下组成:10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个或55个氨基酸。此类肽描述于例如国际公布号 W02016032949中,所述专利特此整体并入本文。

[0092] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或功能片段包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:1中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0093] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:2中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0094] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:3的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:3中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0095] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:4的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:4中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0096] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID

NO:5的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:5中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0097] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:6的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:6中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0098] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:7的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:7中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0099] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:8的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:8中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0100] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:9的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:9中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0101] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:10的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:10中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0102] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:11的氨基酸

序列。在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:11的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:11中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0103] 在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:12的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:12中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0104] 在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:13的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:13中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0105] 在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:14的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:14中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0106] 在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:15的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:15中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0107] 在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:16的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为

包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:16中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0108] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:17的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:17中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0109] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含相对于SEQ ID NO:18的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:18中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0110] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含多种淀粉样蛋白结合肽。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽被组织成阵列(即一个接一个)。

[0111] 形成全部或部分淀粉样蛋白结合肽或其功能片段的氨基酸可以是天然存在的氨基酸、非天然存在的氨基酸、经翻译后修饰的氨基酸、酶促合成的氨基酸、衍生化的氨基酸、被设计用于模拟氨基酸的构建体或结构等的立体异构体和修饰。。形成本发明的肽的氨基酸可以是在天然存在的蛋白质中发现的20种常见氨基酸中的一种或多种,或者是经修饰的和不常见的氨基酸中的一种或多种。

[0112] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含球状蛋白结构域。在一些实施方案中,球状蛋白结构域充当间隔子以将淀粉样蛋白结合肽或其功能片段定位远离受体的跨膜结构域,并且因此远离包含嵌合受体的细胞表面。在一些实施方案中,球状蛋白结构域的长度约为约100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个或115个氨基酸。在一些实施方案中,球状蛋白结构域是免疫球蛋白结构域。在一些实施方案中,球状蛋白结构域是惰性的。在一些实施方案中,球状蛋白结构域缺乏对底物的特异性结合。在一些实施方案中,球状蛋白结构域是重链恒定结构域或其片段,如CH2结构域或其片段。在一些实施方案中,球状蛋白结构域是荧光蛋白,例如,GFP。在一些实施方案中,球状蛋白结构域是载体蛋白。

[0113] 在一些实施方案中,细胞外结构域还包含免疫球蛋白恒定结构域或其片段。在一些实施方案中,细胞外结构域包含重链恒定结构域或其片段。在一些实施方案中,细胞外结构域包含CH2结构域或其片段。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段是小鼠CH2结构域或其片段。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段是人CH2结构域或其片段。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段是IgG2 CH2结构域或其片段。

[0114] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段直接或间接地连接至免疫球蛋白恒定结构域或其片段。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段直接或间

接地连接至重链恒定结构域或其片段。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段直接或间接地连接至CH2结构域或其片段。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段是小鼠CH2结构域。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段是人CH2结构域。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段是IgG2 CH2结构域。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段衍生自pFuse载体。

[0115] 在一些实施方案中,CH2结构域或其片段包含与表2或表3中列出的CH2结构域序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,CH2结构域或其片段包含SEQ ID NO:33设置的氨基酸。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段包含与SEQ ID NO:33中列出的氨基酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CH2结构域或其片段包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,CH2结构域或其片段包含相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:33中总共有1至10个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0117] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含与间隔子连接的淀粉样蛋白结合区。在一些实施方案中,间隔子是淀粉样蛋白结合区的N和/或C端。在一些实施方案中,间隔子包含以下或由以下组成:约3至约55个氨基酸。本发明的间隔肽可包含以下或由以下组成:10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54或55个氨基酸。在一些实施方案中,间隔子长度为约3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、50个、100个或155个氨基酸,包括这些值之间的任何值或范围。在一些实施方案中,间隔子是柔性接头。在一些实施方案中,间隔子不带电。在一些实施方案中,间隔子是甘氨酸丝氨酸接头。在一些实施方案中,间隔子包含VTPTV的氨基酸序列(SEQ ID NO:36)。在一些实施方案中,与间隔子连接的淀粉样蛋白结合区包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施方案中,与间隔子连接的淀粉样蛋白结合区包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0118] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含N端分泌前导序列。在一些实施方案中,N端分泌前导序列包含CD8的片段。在一些实施方案中,N端分泌前导序列包含CD8铰链结构域的片段。在一些实施方案中,N端分泌前导序列包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。在一些实施方案中,N端分泌前导包含与SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0119] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区,所述淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段和恒定结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区,所述淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、间隔子和恒定结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区,所述淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含N端分泌前导序列、淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、间隔子和恒定结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域包含淀粉样蛋白结

合区,所述淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段和CH2结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区,所述淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、间隔子和CH2结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区,所述淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含N端分泌前导序列、淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、间隔子和CH2结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区,所述淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含N端分泌前导序列、淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、间隔子、CH2结构域和第二间隔子。

[0120] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含如表2中所示的淀粉样蛋白结合区(例如,包含如表2中所示的p5+14-间隔子和CH2结构域的氨基酸序列)。

[0121] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含有包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合区。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含与SEQ ID NO:37中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含相对于SEQ ID NO:37的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合区结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:37中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0122] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含如表3中所示的淀粉样蛋白结合区(例如,包含如表3中所示的“最终CAR-P构建体”的细胞外结构域)。

[0123] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含有包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合区。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含与SEQ ID NO:44中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含相对于SEQ ID NO:44的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合区结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:44中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0124] 在某些示例性实施方案中,多个相同或不同的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段可以连接至细胞外结构域。

[0125] 2. 衍生自结合人淀粉样蛋白原纤维抗体的淀粉样蛋白结合区

[0126] 本文提供了包含有包含淀粉样蛋白结合区的细胞外结构域的嵌合受体。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含重链可变区(VH)。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含11-1F4抗体片段。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区衍生自11-1F4。

[0127] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含抗体11-1F4的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR,如表B中所示。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含抗体11-1F的VH

和/或VL。

[0128] 表B.11-1F4 CDR的氨基酸序列

	<b>11-1F4 CDR</b>	<b>氨基酸序列</b>	<b>SEQ ID NO</b>
[0129]	CDR-L1	RSSQSLVHRNGNTYLH	24
	CDR-L2	KVSNRFS	25
	CDR-L3	FQTTYVPNT	26
[0130]	CDR-H1	GFSLSSYGVS	21
	CDR-H2	VIWGDGSTNYHPNLMS	22
	CDR-H3	LDY	23

[0131] 在特定实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含VH,所述VH包含:(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-H2,和(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-H3。

[0132] 在特定实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含VL,所述VL包含:(a)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-L1;(b)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR-L3。

[0133] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含有包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VH。

[0134] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH。

[0135] 在另一个方面,淀粉样蛋白结合区包含VH,所述VH包含:包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H1、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-H2和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-H3;和VL,所述VL包含:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-L1、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR-L3。

[0136] 在另一个方面,淀粉样蛋白结合区包含具有SEQ ID NO:20中列出的序列的VH的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及具有SEQ ID NO:19中列出的序列的VL的VL CDR1、VL CDR2和VL。

[0137] 在另一个方面,淀粉样蛋白结合区包含具有SEQ ID NO:35中列出的序列的VH的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及具有SEQ ID NO:35中列出的序列的VL的VL CDR1、VL CDR2和VL。

[0138] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含VH序列,所述VH序列与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含相对于SEQ ID NO:20的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的VH序列,但保留了作为包含有包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VH的淀粉样蛋白结合区结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:20中总共有1至13个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在CDR以外的区域(即,在FR中)。在特定实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含VH,所述VH包含选自由以下组成的组的一个、两个或三个CDR:(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-H2,和(c)包含SEQ ID NO:

23的氨基酸序列的CDR-H3。

[0139] 在另一个方面,淀粉样蛋白结合区包含VL,所述VL与SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含相对于SEQ ID NO:19的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的VL序列,但保留了作为包含有包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL的淀粉样蛋白结合区结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:19中总共有1至11个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在CDR以外的区域(即,在FR中)。在特定实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含VL,所述VL包含选自以下组成的组的一个、两个或三个CDR:(a)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-L1;(b)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR-L3。

[0140] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含VH序列,所述VH序列与SEQ ID NO:35的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含相对于SEQ ID NO:35的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的VH序列,但保留了作为包含有包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH的淀粉样蛋白结合区结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:35中总共有1至13个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在CDR以外的区域(即,在FR中)。在特定实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含VH,所述VH包含选自以下组成的组的一个、两个或三个CDR:(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H1,(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-H2,和(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-H3。

[0141] 在另一个方面,淀粉样蛋白结合区包含VL,所述VL与SEQ ID NO:34的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含相对于SEQ ID NO:34的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的VL序列,但保留了作为包含有包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL的淀粉样蛋白结合区结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:34中总共有1至11个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在CDR以外的区域(即,在FR中)。在特定实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含VL,所述VL包含选自以下组成的组的一个、两个或三个CDR:(a)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-L1;(b)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR-L3。

[0142] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含具有一个或多个保守氨基酸取代的抗体11-1F4的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含具有一个或多个保守氨基酸取代的抗体11-1F4的VH和/或VL。

[0143] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),其中VL包含:包含SEQ ID NO:24中列出的氨基酸序列的CDR-L1(具有一个或多个保守氨基酸取代)、包含SEQ ID NO:25中列出的氨基酸序列的CDR-L2(具有一个或多个保守氨基酸取代)和包含SEQ ID NO:26中列出的氨基酸序列的CDR-L3(具有一个或多个保守氨基酸取代),并且VH包含:包含SEQ ID NO:21中列出的氨基酸序列的CDR-H1(具有一个或多个保守

氨基酸取代)、包含 SEQ ID NO:22中列出的氨基酸序列的CDR-H2 (具有一个或多个保守氨基酸取代)和包含SEQ ID NO:23中列出的氨基酸序列的CDR-H3 (具有一个或多个保守氨基酸取代)。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,分别包含具有SEQ ID NO:20中列出的序列的VH的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的氨基酸序列,具有一个或多个保守氨基酸取代;以及CDR-L1、CDR-L2 和CDR-L3,分别包含具有SEQ ID NO:19中列出的序列的VL的 CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的氨基酸序列,具有一个或多个保守氨基酸取代。

[0144] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含人源化抗体片段(例如,11-1F4的人源化片段)。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含衍生自11-1F4的人源化scFv。

[0145] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含通过接头融合的VH 和VL。在一些实施方案中,接头是scFv接头。在一些实施方案中,接头包含以下或由以下组成:约3至约55个氨基酸。本发明的接头可包含以下或由以下组成:10个、11个、12个、13个、14个、15 个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24 个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33 个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42 个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51 个、52个、53个、54或55个氨基酸。在一些实施方案中,接头长度为约3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12 个、13个、14个、15个、16个、17个、18 个、19个、20个、21 个、22个、23个、24个、25个、50个、100个或155个氨基酸,包括这些值之间的任何值或范围。在一些实施方案中,接头是柔性接头。在一些实施方案中,接头不带电。在一些实施方案中,接头是甘氨酸丝氨酸接头。在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含VL、接头和VH。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区从N端到C端包含VH、接头和VL。

[0146] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含与间隔子连接的淀粉样蛋白结合区。在一些实施方案中,间隔子是淀粉样蛋白结合区的N和/ 或C端。在一些实施方案中,间隔子包含以下或由以下组成:约3 至约55个氨基酸。本发明的间隔肽可包含以下或由以下组成:10 个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25 个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40 个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54或55个 氨基酸。在一些实施方案中,间隔子长度为约3个、4个、5个、6个、7 个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、50个、100个或155个氨基酸,包括这些值之间的任何值或范围。在一些实施方案中,间隔子是柔性 接头。在一些实施方案中,间隔子不带电。在一些实施方案中,间隔子是甘氨酸丝氨酸接头。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列。

[0147] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区包含N端分泌前导序列。在一些实施方案 中,N端分泌前导序列是可切割的N端分泌前导序列。在一些实施方案中,N端分泌前导序列 包含CD8 $\alpha$ 链,例如小鼠CD8 $\alpha$ 链的片段。在一些实施方案中,N端分泌前导序列包含小鼠 CD8 $\alpha$  链的残基1-27(例如,UniProtKB号P01731[CD8A\_小鼠]的残基1-27)。在一些实施方案中,N 端分泌前导序列包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列。在一些实施方案中,N端分泌前导序列 包含与SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞外结构域从N端到C端包含N端分泌 前导序列、VL、接头和VH。在一些实施方案中,细胞外结构域从N端到C端包含N端分泌前导序

列、VH、接头和VL。

[0148] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区是单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,scFv包含VH和VL。在一些实施方案中,VH和/或VL是本文所述的VH和VL中的任一种。在一些实施方案中,scFv包含有包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VH。在一些实施方案中,scFv包含有包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VL,和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH。在一些实施方案中,scFv从N端到C端包含VL、接头和VH。在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv从N端到C端包含N端分泌前导序列、VL、接头和VH。在一些实施方案中,N端分泌前导序列包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在一些实施方案中,N端分泌前导序列包含与SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0149] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含有包含scFv的淀粉样蛋白结合区。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含与SEQ ID NO:47中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含与SEQ ID NO:47的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,scFv包含相对于SEQ ID NO:47的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合区结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:47中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0150] 在一些实施方案中,细胞外结构域包含有包含scFv的淀粉样蛋白结合区。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含与SEQ ID NO:48中列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv包含与SEQ ID NO:48的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,scFv包含相对于SEQ ID NO:48的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合区结合淀粉样蛋白的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:48中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0151] 在一些实施方案中,细胞外结构域从N端到C端包含VL、接头、VH和间隔子。在一些实施方案中,细胞外结构域从N端到C端包含VH、接头、VL和间隔子。在一些实施方案中,细胞外结构域从N端到C端包含scFv和间隔子。细胞外结构域的示例性结构图解于图6中。(参见例如图(i)11-1F4)。

[0152] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以小于约100 $\mu$ M、10 $\mu$ M、1 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M、0.01 $\mu$ M的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白原纤维。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以约0.01 $\mu$ M、0.05 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M、0.2 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M、0.4 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M、0.6 $\mu$ M、0.7 $\mu$ M、0.8 $\mu$ M、0.9 $\mu$ M、1 $\mu$ M、2 $\mu$ M、3 $\mu$ M、4 $\mu$ M、5 $\mu$ M、6 $\mu$ M、7 $\mu$ M、8 $\mu$ M、9 $\mu$ M、10 $\mu$ M、15 $\mu$ M、20 $\mu$ M、25 $\mu$ M、50 $\mu$ M、75 $\mu$ M或100 $\mu$ M(包括这些值之间的任何值或范围)的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白原纤维。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以小于500nM、100nM、10nM或1nM的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白

原纤维。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以小于约5nM、10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、250nM、500nM、750nM、1000nM、2000nM或2200nM的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白原纤维。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以约5nM、10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、250nM、500nM、750nM、1000nM、2000nM或2200nM(包括这些值之间的任何值或范围)的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白原纤维。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以约40-50nM的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白原纤维。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以40-50nM的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白原纤维。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以小于50nM的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白原纤维。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区以小于c11-1F4结合至人淀粉样蛋白原纤维的 $K_d$ 的解离常数( $K_d$ )结合至人淀粉样蛋白原纤维。

[0153] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区在小于约0.01 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M或1 $\mu$ M的抗体浓度( $EC_{50}$ )下以半数最大结合与人淀粉样蛋白原纤维结合。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区在约0.01 $\mu$ M、0.05 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M、0.2 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M、0.4 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M、0.6 $\mu$ M、0.7 $\mu$ M、0.8 $\mu$ M、0.9 $\mu$ M、1 $\mu$ M、2 $\mu$ M、3 $\mu$ M、4 $\mu$ M、5 $\mu$ M、6 $\mu$ M、7 $\mu$ M、8 $\mu$ M、9 $\mu$ M或10 $\mu$ M(包括这些值之间的任何值或范围)的抗体浓度( $EC_{50}$ )下以半数最大结合与人淀粉样蛋白原纤维结合。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区在小于约1nM、10nM、100nM或1000nM的抗体浓度( $EC_{50}$ )下以半数最大结合与人淀粉样蛋白原纤维结合。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区在约1nM、5nM、10nM、15nM、20nM、25nM、30nM、35nM、40nM、45nM、50nM、55nM、60nM、65nM、70nM、75nM、80nM、85nM、90nM、95nM、100nM、100nM、250nM、500nM、750nm或1000nM(包括这些值之间的任何值或范围)的抗体浓度( $EC_{50}$ )下以半数最大结合与人淀粉样蛋白原纤维结合。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区在约17nM、7nM、16nM、75nM或95nM的抗体浓度( $EC_{50}$ )下以半数最大结合与人淀粉样蛋白原纤维结合。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区在小于约10nM、20nM、80nM或100nM的抗体浓度( $EC_{50}$ )下以半数最大结合与人淀粉样蛋白原纤维结合。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合区在小于c11-1F4与人淀粉样蛋白原纤维结合的 $EC_{50}$ 的抗体浓度( $EC_{50}$ )下以半数最大结合与人淀粉样蛋白原纤维结合。

[0154] 用于计算解离常数和 $EC_{50}$ 的方法在本领域中是已知的,并且包括例如表面等离子体共振和EuLISA。在一些实施方案中,例如使用表面等离子体共振,通过测量与Len(1-22)单体肽的结合来确定解离常数。在一些实施方案中,使用EuLISA来确定 $EC_{50}$ 。在一些实施方案中,使用EuLISA测定 $EC_{50}$ 以测量与rV $\lambda$ 6W11原纤维、Per125 wtATTR提取物、Ken ATTR提取物、SHI AL $\lambda$ 肝提取物或TAL AL $\kappa$ 肝提取物的结合水平。

#### [0155] B. 跨膜结构域

[0156] 本文提供了包含跨膜结构域的嵌合受体。在一些实施方案中,跨膜结构域将细胞外结构域连接至细胞质结构域。

[0157] 跨膜结构域可以衍生自天然存在的蛋白质或来自合成来源。在其中来源是天然存在的蛋白质的一些实施方案中,跨膜结构域可以衍生自任何膜结合或跨膜蛋白质。在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自(即,包含至少其跨膜区)T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、Toll样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8和TLR9。在一些实施方案中,跨膜结构域包含铰链,例如人Ig(免疫球蛋白)铰链。

[0158] 在一些实施方案中,跨膜结构域融合至N端间隔子(例如,细胞外结构域和跨膜结构域之间的间隔子,如图6中所图解)。在一些实施方案中,间隔子包含以下或由以下组成:约3至约55个氨基酸。本发明的间隔肽可包含以下或由以下组成:10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54或55个氨基酸。在一些实施方案中,间隔子长度为约3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、50个、100个或155个氨基酸,包括这些值之间的任何值或范围。在一些实施方案中,间隔子是柔性接头。在一些实施方案中,间隔子不带电。在一些实施方案中,间隔子是甘氨酸丝氨酸接头。在一些实施方案中,间隔子包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0159] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含如表1中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含如表3中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自CD8。在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自CD8 $\alpha$ 链。在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自小鼠CD8 $\alpha$ 链。在一些实施方案中,跨膜结构域包含来自小鼠CD8 $\alpha$ 链的残基148-218(例如,UniProtKB号P01731的残基148-218)。在一些实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自人CD8 $\alpha$ 链。在一些实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:57的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0160] 在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的跨膜结构域。在其中跨膜结构域是合成的一些实施方案中,跨膜结构域主要包含疏水残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中,跨膜结构域包含合成跨膜结构域的每一端的苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸三联体。

#### [0161] C. 细胞质结构域

[0162] 本文提供了包含细胞质结构域的嵌合受体。在一些实施方案中,细胞质结构域包含受体的信号传导结构域,所述信号传导结构域在被活化时活化吞噬细胞(例如,巨噬细胞)。

[0163] 在一些实施方案中,细胞质结构域包含吞噬作用信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞质结构域包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)(参见例如,Morrissey, M.A., 等人, *Elife*, 2018.7)。在一些实施方案中,细胞质结构域包含CD19的片段或区域。在一些实施方案中,细胞质结构域包含CD3 $\zeta$ 的片段或区域。在一些实施方案中,细胞质结构域包含FcR的片段或区域,例如, FcR  $\gamma$  亚基。在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自CD19、CD3 $\zeta$ 和/或FcR。示例性细胞质结构域进一步描述于Morrissey, M.A., 等人, *Elife*, 2018.7中。

[0164] 在一些实施方案中,细胞质结构域包含细胞质结构域I、细胞质结构域II或其功能

片段。在一些实施方案中,细胞质结构域包含与表 1或表3中列出的细胞质结构域I或细胞质结构域II的序列具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0165] 在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自CD19。在一些实施方案中,衍生自CD19的细胞质结构域被称为“细胞质结构域I”。在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自小鼠CD19。在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自人CD19。在一些实施方案中,细胞质结构域包含小鼠CD19的氨基酸残基500-534(例如,UniProtKB号P25918的氨基酸残基500-534)。在一些实施方案中,细胞质结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞质结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,细胞质结构域包含相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的细胞质结构域活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:30中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,细胞质结构域包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞质结构域包含与 SEQ ID NO:42的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,细胞质结构域包含相对于SEQ ID NO:42的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的细胞质结构域活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:42中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0166] 在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自Fc受体(FcR)。在一些实施方案中,衍生自Fc受体的细胞质结构域被称为“细胞质结构域 II”。在一些实施方案中,细胞质结构域包含小鼠Fc ERG前体的氨基酸残基19-86(例如,UniProtKB号P20491的氨基酸残基19-86)。在一些实施方案中,细胞质结构域包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞质结构域包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,细胞质结构域包含相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的细胞质结构域活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:31中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,细胞质结构域包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞质结构域包含与SEQ ID NO:41的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,细胞质结构域包含相对于SEQ ID NO:41的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的细胞质结构域活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:41中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,细胞质结构域包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞质结构域包含与SEQ ID NO:45 的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,细胞质结构域包含相对于SEQ ID NO:45的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或

缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的细胞质结构域活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:45中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0167] 在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自CD19和FcR。在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自小鼠CD19和FcR。在一些实施方案中,细胞质结构域包含小鼠CD19的氨基酸残基500-534(例如 UniProtKB号P25918的氨基酸残基500-534)和小鼠Fc ERG前体的氨基酸残基19-86(例如UniProtKB号P20491的氨基酸残基19-86)。在一些实施方案中,细胞质结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列和 SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞质结构域包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列和SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,细胞质结构域包含相对于SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:31的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31的氨基酸序列的细胞质结构域活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:31中总共有1至5个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,细胞质结构域从N端到C端包含衍生自FcR的结构域和衍生自CD19的结构域。

[0168] 在一些实施方案中,两个或更多个细胞质结构域通过肽间隔子连接。

[0169] 在一些实施方案中,细胞质结构域是甘露糖受体、补体受体1、补体受体3或补体受体4、清道夫受体或FC $\gamma$ 受体。

[0170] 在一些实施方案中,细胞质结构域包含共刺激结构域。在一些实施方案中,细胞质结构域包含衍生自Toll样受体2的结构域。

[0171] 在一些实施方案中,淀粉样蛋白与细胞外结构域的结合活化了嵌合受体的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体的细胞质结构域的活化包括受体的信号传导结构域的活化。在一些实施方案中,嵌合受体的细胞质结构域的活化导致吞噬细胞(例如,巨噬细胞)的活化。在一些实施方案中,活化的吞噬细胞吞噬淀粉样蛋白。

[0172] D. 全长嵌合受体构建体

[0173] 本文提供了结合淀粉样蛋白(例如,人淀粉样蛋白原纤维)的嵌合受体。在一些实施方案中,所述嵌合受体包含:细胞质结构域,其中所述细胞质结构域包含受体的信号传导结构域,所述信号传导结构域在被活化时活化吞噬细胞(例如,巨噬细胞);跨膜结构域;和细胞外结构域,其中所述细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区。嵌合受体的细胞质结构域、跨膜结构域和细胞外结构域可以是本文所述的细胞质结构域、跨膜结构域和细胞外结构域中的任一种。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体在细胞外结构域的N端还包含N端分泌前导序列。嵌合受体的示例性结构图提供于图1和图6中,并且嵌合受体的示例性氨基酸序列提供于表C中。

[0174] 表C. 示例性全长嵌合受体构建体的氨基酸序列

构建体名称	描述	氨基酸序列	SEQ ID NO:
CAR-P 构建体 -345aa, 参见表 3。	基于肽的 CAR (从 N 端到 C 端) 具有 N 端分泌前导序列、p5、间隔子、CH2 结构域、间隔子、跨膜结构域、细胞质结构域 II 和细胞质结构域 I。	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQF RVSPTVGGGYSKAQKAQAKQAK QAQKAQKAQAKQAKQVTPTVFN LLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWVFN EVHTAQQTQTHREDYNSTLRV VSA LPIQHQDWMSGKEFKCKV NNDL PAPIERTISKPKTTTTK PVLRTSPVH PTGTSQPQRPE DCRPRGSVKGTGL DFACDIYI WAPLAGICVALLLSLIIT LICLGEPQLCYILDAVLFYGI VLTLYCRLKIQVRKAAIASRE KADAVY TGLNTRSQETYETL KHEKPPQLYA APQLHSIQSG PSHEEDADSYENMD KSDDL EPA	43
[0175] 缺乏细胞质结构域 I 的 CAR-P 构建体。	基于肽的 CAR (从 N 端到 C 端) 具有 N 端分泌前导序列、p5、间隔子、CH2 结构域、间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域 II。  缺乏细胞质结构域 I。	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQF RVSPTVGGGYSKAQKAQAKQAK QAQKAQKAQAKQAKQVTPTVFN LLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWVFN EVHTAQQTQTHREDYNSTLRV VSA LPIQHQDWMSGKEFKCKV NNDL PAPIERTISKPKTTTTK PVLRTSPVH PTGTSQPQRPE DCRPRGSVKGTGL DFACDIYI WAPLAGICVALLLSLIIT LICLGEPQLCYILDAVLFYGI VLTLYCRLKIQVRKAAIASRE KADAVY TGLNTRSQETYETL KHEKPPQ	51
缺乏 N 端分泌前导序列的 CAR-P	基于肽的 CAR (从 N 端到 C 端) 具有 p5、间隔子、CH2 结构域、间隔子、跨膜结构	TVGGGYSKAQKAQAKQAKQAK AQKAQAKQAKQVTPTVFNLLGGP SVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVV VDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPA PIER	52

结构	域、细胞质结构域 II 和细胞质结构域 I。  缺乏 N 端分泌前导序列。	TISKPKTTTTKPVLRTPSPVHPTGTS QPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICL GEPQLCYILDAVLFLYGIVLTLLY CRLKIQVRKAAIASREKADAVYT GLNTRSQETYETLKHEKPPQLYAA PQLHSIQSGPSHEEDADSYENMDK SDDLEPA	
缺乏 N 端分泌前导序列和细胞质结构域 I 的 CAR-P 构建体。	基于肽的 CAR (从 N 端到 C 端) 具有 p5、间隔子、CH2 结构域、间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域 II。  缺乏 N 端分泌前导序列细胞质结构域 I。	TVGGGYSKAQKAQAKQAKQAKQAKQAKQAKQAKQVTPTPVNLGGP SVFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVV DVSEDDPDVQISWVNNVEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH DWMSGKEFKCKVNNKDLPIER TISKPKTTTTKPVLRTPSPVHPTGTS QPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFAC DIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICL EPQLCYILDAVLFLYGIVLTLLYCR LKIQRKAAIASREKADAVYTGLN TRSQETYETLKHEKPPQ	53
11-1F4 <sup>CA</sup> R <sup>串联</sup> , 参见表 1。	基于 scFv 的 CAR (从 N 端到 C 端) 具有 N 端分泌前导序列、11-1F4 VL、scFv 接头、11-1F4 VH、间隔子、跨膜结构域、细胞质结构域 II 和细胞质结构域 I。	MASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSG EADIVLTQSPASLAVSLGQRATISY RASKSVSTSGYSYMHWNQKPG QPPRLLIYLVNLESGVPARFSGSG SGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQH IRELTRFGGGTKLEIKRGGSSRSS SGGGGSGGGGQVQLKESGPGVA PSQSLITCTVSGFSLSSYGVS WVRQPPGKGLEWLGVIWGDG STNYHPNLMSRSL SISKDISKSQVLFKLN SLQTDDTATYYCVTL DYWGQGTSVTVSKVN STTTKPVLRTPSPVHPTG TSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFA CDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLIC GEPQLCYILDAVLFLYGIVLTLLY CRLKIQVRKAAIASREKADAVYT GLNTRSQETYETLKHEKPPQAESY ENADEELAQPVGRMMDFLSPHGS AWDPSRE	50
缺乏细胞质结构域 I 的 11-1F4 <sup>CA</sup> R <sup>串联</sup> 。	基于 scFv 的 CAR (从 N 端到 C 端) 具有 N 端分泌前导序列、11-1F4 VL、scFv 接头、11-1F4 VH、间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域 II。	MASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSG EADIVLTQSPASLAVSLGQRATISY RASKSVSTSGYSYMHWNQKPG QPPRLLIYLVNLESGVPARFSGSG SGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQH IRELTRFGGGTKLEIKRGGSSRSS SGGGGSGGGGQVQLKESGPGVA PSQSLITCTVSGFSLSSYGVS WVRQPPGKGLEWLGVIWGDG STNYHPNLMSRSL SISKDISKSQVLFKLN SL	49

[0176]

[0177]

	缺乏细胞质结构域 I。	QTDDTATYYCVTLDYWGQGTSV TVSKVNSTTTKPVLRTPSPVHPTG TSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFA CDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLIC GEPQLCYILDAVLFLYGIVLTLLY CRLKIQVRKAAIASREKADAVYT GLNTRSQETYETLKHEKPPQ	
缺乏 N 端分泌前导序列的 11-1F4 <sup>CA</sup> R 串联。	基于 scFv 的 CAR (从 N 端到 C 端) 具有 11-1F4 VL、scFv 接头、11-1F4 VH、间隔子、跨膜结构域、细胞质结构域 II 和细胞质结构域 I。  缺乏 N 端分泌前导序列。	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRA SKSVSTSGYSYMHWNQKPGQPP RLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGT DFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIREL TRFGGGTKLEIKRGGSSRSSSSGG GGSGGGGQVQLKESGPGLVAPSQS LSITCTVSGFSLSSYGVSWVRQPP GKGLEWLGVIWGDGSTNYHPNL MSRSLSISKDISKSQVLFKLNSLQT DDTATYYCVTLDYWGQGTSVTVS KVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQ PQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDI YIWAPLAGICVALLLSLIITLICGEP QLCYILDAVLFLYGIVLTLLYCRLK IQVRKAAIASREKADAVYTGLNTR SQETYETLKHEKPPQAESYENADE ELAQPVGRMMDFLSPHGS AWDP SRE	55
缺乏 N 端分泌前导序列和细胞质结构域 I 的 11-1F4 <sup>CA</sup> R 串联	基于 scFv 的 CAR (从 N 端到 C 端) 具有 11-1F4 VL、scFv 接头、11-1F4 VH、间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域 II。  缺乏 N 端分泌前导序列和细胞质结构域 I。	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRA SKSVSTSGYSYMHWNQKPGQPP RLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGT DFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIREL TRFGGGTKLEIKRGGSSRSSSSGG GGSGGGGQVQLKESGPGLVAPSQS LSITCTVSGFSLSSYGVSWVRQPP GKGLEWLGVIWGDGSTNYHPNL MSRSLSISKDISKSQVLFKLNSLQT DDTATYYCVTLDYWGQGTSVTVS KVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQ PQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDI YIWAPLAGICVALLLSLIITLICGEP QLCYILDAVLFLYGIVLTLLYCRLK IQVRKAAIASREKADAVYTGLNTR SQETYETLKHEKPPQ	54

[0178] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含细胞外结构域,所述细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段;跨膜结构域;和细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、第一间隔子、CH2结构域、第二间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含N端分泌前导序列、淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、第一间隔子、CH2结构域、第二间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含 SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自FcR。在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自 FcR和CD19。在一些实施方案中,细胞质结构域包含细胞质结构域 II,如表3

中所示。在一些实施方案中,细胞质结构域包含细胞质结构域I和细胞质结构域II,如表3中所示。在一些实施方案中,嵌合受体是如表3中所示的CAR-P。在一些实施方案中,嵌合受体是如表C中所示的基于肽的CAR。在一些实施方案中,嵌合受体包含与表3中作为CAR-P构建体-345aa列出的序列具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,具有或不具有N端分泌前导序列。在一些实施方案中,嵌合受体的每个组分一起或单独地与表3中作为CAR-P构建体-345aa的对应组分具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0179] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含p5的细胞外结构域、第一间隔子、IgG2 CH2结构域、第二间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含p5的细胞外结构域、第一间隔子、IgG2 CH2结构域、第二间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、包含p5的细胞外结构域、第一间隔子、IgG2 CH2结构域、第二间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、包含p5的细胞外结构域、第一间隔子、IgG2 CH2结构域、第二间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。

[0180] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含p5+14的细胞外结构域、第一间隔子、IgG2 CH2结构域、第二间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含p5+14的细胞外结构域、第一间隔子、IgG2 CH2结构域、第二间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、包含p5+14的细胞外结构域、第一间隔子、IgG2 CH2结构域、第二间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、包含p5+14的细胞外结构域、第一间隔子、IgG2 CH2结构域、第二间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。

[0181] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:细胞外结构域,其包含根据SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列的p5+14和第一间隔子,以及根据SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的CH2结构域;第二间隔子;跨膜结构域;和细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:细胞外结构域,其包含根据SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列的p5+14和第一间隔子,以及根据SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的CH2结构域;第二间隔子;衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:细胞外结构域,其包含根据SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列的p5+14和第一间隔子,以及根据SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的CH2结构域;第二间隔子;衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR的细胞质结构域。

[0182] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:细胞外结构域,其包含根据SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列的N端分泌前导序列、根据SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段和第一间隔子,以及根据SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的CH2结构域;根据SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列的第二间隔子和跨膜结构域;和细胞质结构域,其包含根据SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列的细胞质结构域II和根据SEQ

ID NO:42中列出的氨基酸序列的细胞质结构域I。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:细胞外结构域,其包含根据SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列的N端分泌前导序列、根据SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段和第一间隔子,以及根据SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的CH2结构域;根据SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列的第二间隔子和跨膜结构域;和细胞质结构域,其包含根据SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列的细胞质结构域II。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:细胞外结构域,其包含根据SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段和第一间隔子,以及根据SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的CH2结构域;根据SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列的第二间隔子和跨膜结构域;和细胞质结构域,其包含根据SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列的细胞质结构域II和根据SEQ ID NO:42中列出的氨基酸序列的细胞质结构域I。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:细胞外结构域,其包含根据SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段和第一间隔子,以及根据SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的CH2结构域;根据SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列的第二间隔子和跨膜结构域;和细胞质结构域,其包含根据SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列的细胞质结构域II。

[0183] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段(例如,p5或p5-14)、第一间隔子和CH2结构域的细胞外结构域;第二间隔子;衍生自CD8  $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:43的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:43中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0184] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段(例如,p5或p5-14)、第一间隔子和CH2结构域的细胞外结构域;第二间隔子;衍生自CD8  $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:51的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:51中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0185] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段(例如,p5或p5-14)、第一间隔子和CH2结构域的细胞外结构域;第二间隔子;衍生自CD8  $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含与SEQ ID NO:52的氨基酸

序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:52的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:52中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0186] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段(例如,p5或p5-14)、第一间隔子和CH2结构域的细胞外结构域;第二间隔子;衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含 SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含与 SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:53的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含 SEQ ID NO:53的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:53中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0187] 在一些实施方案中,嵌合受体从N-端到C-端包含:包含抗体片段或其功能片段(例如,衍生自11-1F4的抗体片段或其功能片段)的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含VL、接头、VH、间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含N端分泌前导序列、VL、接头、VH、间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,VH包含:(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H1、(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-H2和(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-H3;并且VL包含:(a)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-L1;(b)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR-L3。在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自FcR。在一些实施方案中,细胞质结构域衍生自FcR和CD19。在一些实施方案中,细胞质结构域包含细胞质结构域II,如表1中所示。在一些实施方案中,细胞质结构域包含细胞质结构域I和细胞质结构域II,如表1中所示。在一些实施方案中,嵌合受体是如表1中所示的<sup>11-1F4</sup>CAR<sub>串联</sub>受体。在一些实施方案中,嵌合受体是如表G中所示的基于scFv的CAR。

[0188] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含衍生自11-1F4的抗体片段或其功能片段的细胞外结构域、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含衍生自11-1F4的抗体片段或其功能片段的细胞外结构域、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:衍生自11-1F4的VL、接头、衍生自11-1F4的VH、间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:衍生自11-1F4的VL、接头、衍生自11-1F4的VH、间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、衍生自11-1F4的VL、接头、衍生自11-1F4的VH、间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端

到C端包含:N端分泌前导序列、衍生自11-1F4的VL、接头、衍生自11-1F4的VH、间隔子、衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。

[0189] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列的N端分泌前导序列、包含SEQ ID NO:19 中列出的氨基酸序列的VL、包含SEQ ID NO:27中列出的氨基酸序列的scFv接头、包含SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列的VH、包含SEQ ID NO:29中列出的氨基酸序列的间隔子和跨膜结构域,以及包含SEQ ID NO:31中列出的氨基酸序列的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列的N端分泌前导序列、包含SEQ ID NO:19中列出的氨基酸序列的VL、包含SEQ ID NO:27中列出的氨基酸序列的scFv接头、包含SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列的VH、包含SEQ ID NO:29中列出的氨基酸序列的间隔子和跨膜结构域,以及包含SEQ ID NO:31中列出的氨基酸序列和SEQ ID NO:30中列出的氨基酸序列的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含SEQ ID NO:19中列出的氨基酸序列的VL、包含SEQ ID NO:27 中列出的氨基酸序列的scFv接头、包含SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列的VH、包含SEQ ID NO:29中列出的氨基酸序列的间隔子和跨膜结构域,以及包含SEQ ID NO:31中列出的氨基酸序列的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含SEQ ID NO:19中列出的氨基酸序列的VL、包含SEQ ID NO:27中列出的氨基酸序列的scFv接头、包含SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列的VH、包含SEQ ID NO:29中列出的氨基酸序列的间隔子和跨膜结构域,以及包含SEQ ID NO:31中列出的氨基酸序列和SEQ ID NO:30 中列出的氨基酸序列的细胞质结构域。

[0190] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、包含衍生自11-1F4的scFv的细胞外结构域;间隔子;衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,嵌合受体包含相对于 SEQ ID NO:50的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:50中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0191] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、包含衍生自11-1F4的scFv的细胞外结构域;间隔子;衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:49的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在 SEQ ID NO:49中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0192] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含衍生自11-1F4的scFv的细胞外结构域;间隔子;衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR和CD19的细胞质结构域。在一

些实施方案中,嵌合受体包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:55的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:55中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0193] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端到C端包含:包含衍生自11-1F4的scFv的细胞外结构域;间隔子;衍生自CD8 $\alpha$ 链的跨膜结构域;和衍生自FcR的细胞质结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:54的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:54中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0194] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合受体结合至淀粉样蛋白沉积物或原纤维(例如,人淀粉样蛋白沉积物或原纤维)。在一些实施方案中,嵌合受体的淀粉样蛋白结合区结合至淀粉样蛋白中的一种或多种淀粉样蛋白生成性肽。在一些实施方案中,由嵌合受体的淀粉样蛋白结合区结合的淀粉样蛋白包括淀粉样蛋白生成性 $\lambda$ 6可变结构域蛋白(VL6W11)或淀粉样蛋白生成性免疫球蛋白轻链(AL)、AB(1-40)淀粉样蛋白样原纤维或淀粉样蛋白生成性AB前体蛋白或血清淀粉样蛋白蛋白质A(AA)。在其他实施方案中,由嵌合受体的淀粉样蛋白结合区结合的淀粉样蛋白包括以下的淀粉样蛋白生成性形式:免疫球蛋白重链(AH)、 $\beta_2$ -微球蛋白( $\beta_2$ M)、甲状腺素运载蛋白变体(ATTR)、载脂蛋白AI(AApoAI)、载脂蛋白AII(AApoAII)、凝溶胶蛋白(AGel)、溶菌酶(ALys)、白细胞趋化因子(ALect2)、纤维蛋白原 $\alpha$ 变体(AFib)、胱抑素变体(ACys)、降血钙素(ACal)、乳凝集素(AMed)、胰岛淀粉样蛋白多肽(AIAPP)、催乳素(APro)、胰岛素(AIns)、朊蛋白(APrP); $\alpha$ -突触核蛋白(A $\alpha$ Syn)、tau(ATau)、心房利钠因子(AANF)或IAAP、AL $\kappa$ 4、A1 $\lambda$ 1其他淀粉样蛋白生成性肽。由嵌合受体的淀粉样蛋白结合区结合的淀粉样蛋白生成性肽可以是蛋白质、蛋白质片段或蛋白质结构域。在一些实施方案中,淀粉样蛋白沉积物或淀粉样蛋白原纤维包含重组淀粉样蛋白生成性蛋白质。在一些实施方案中,淀粉样蛋白是疾病病理学的一部分。

[0195] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合受体的细胞质结构域包含信号传导结构域,所述信号传导结构域在被活化时活化吞噬细胞(例如,巨噬细胞)。在一些实施方案中,细胞质结构域的信号传导结构域在嵌合受体与淀粉样蛋白沉积物或原纤维结合时被活化,如上所述。在一些实施方案中,吞噬细胞的活化促进淀粉样蛋白沉积物或原纤维的吞噬作用。

[0196] 在一些实施方案中,嵌合受体与可检测标记缀合。在一些实施方案中,可检测标记选自以下组成的组:放射性核素(例如, $I^{-125}$ 、 $I^{-123}$ 、 $I^{-131}$ 、 $Zr^{-89}$ 、 $Tc^{-99m}$ 、 $Cu^{-64}$ 、 $Br^{-76}$ 、 $F^{-18}$ );酶(辣根过氧化物酶);生物素;和荧光团等。本领域已知的用于可检测地标记蛋白质的任何手段都可用于和/或适用于本文所述的方法。例如,嵌合受体可用放射性同位素进行放

放射性标记,或用荧光标签或化学发光标签进行标记。示例放射性同位素包括例如<sup>18</sup>F、<sup>111</sup>In、<sup>99m</sup>Tc和<sup>123</sup>I以及<sup>125</sup>I。这些和其他放射性同位素可使用众所周知的化学方法连接至嵌合受体,所述化学方法可能涉及或可能不涉及使用螯合剂,例如,如与嵌合受体共价连接的DTPA或DOTA。示例荧光或化学发光标签包括荧光素、德克萨斯红、罗丹明、Alexa染料和荧光素酶,它们可通过与赖氨酸、半胱氨酸、谷氨酸和天冬氨酸侧链反应而与嵌合受体缀合。在一个示例实施方案中,使用荧光微孔板读数仪或荧光计,使用对于所使用的标签而言适当的激发和发射波长来检测标记。例如,可根据放射性发射的类型使用伽马或闪烁计数器以及通过使用适合于准确检测特定放射性核素的能量窗口来检测放射性标记。然而,任何其他合适的检测放射性同位素的技术也可用于检测标记。在一些实施方案中,可检测标记是<sup>125</sup>I。在一些实施方案中,嵌合受体与荧光蛋白融合。在一些实施方案中,嵌合受体与GFP融合。

[0197] 本文还提供了包含本文所述嵌合受体中的任一种的药物组合物。在一些实施方案中,所述药物组合物还包含药学上可接受的载剂。

[0198] III. 核酸、载体、宿主细胞和制备嵌合受体的方法

[0199] A. 编码嵌合受体的核酸

[0200] 本文提供了编码结合淀粉样蛋白的嵌合受体的核酸。在一些实施方案中,核酸编码本文所述的嵌合受体中的任一种。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含:细胞质结构域,其中所述细胞质结构域包含受体的信号传导结构域,所述信号传导结构域在被活化时活化巨噬细胞;跨膜结构域;和细胞外结构域,其中所述细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体从N端到C端包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域。

[0201] 在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,其中所述嵌合受体包含:包含淀粉样蛋白结合区的细胞外结构域,其中所述淀粉样蛋白结合区包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段。包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段的淀粉样蛋白结合区可以是包含如本文所述的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段中的任一种的淀粉样蛋白结合区。

[0202] 在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体从N端到C端包含:包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体从N端到C端包含:淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、第一间隔子、CH2结构域、第二间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导序列、淀粉样蛋白结合肽或其功能片段、第一间隔子、CH2结构域、第二间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施方案中,淀粉样蛋白结合肽或其功能片段包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞质结构域包含细胞质结构域II,如表3中所示。在一些实施方案中,细胞质结构域包含细胞质结构域I和细胞质结构域II,如表3中所示。在一些实施方案中,核酸编码如表3中所示的CAR-P。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含与表3中作为CAR-P构建体-345aa列出的序列具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,具有或不具有分泌前导序列。在一些实施方案中,核酸编码的嵌合受体的每个组分一起或单独地与表3中作为CAR-P构建体-345aa的对应组分具有80%、85%、90%、

95%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0203] 在一些实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的嵌合受体。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:43的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:43中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0204] 在一些实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的嵌合受体。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:51的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:51中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0205] 在一些实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的嵌合受体。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:52的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:52中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0206] 在一些实施方案中,核酸编码包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的嵌合受体。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:53的氨基酸序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列,但保留了作为包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:53中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0207] 在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,其中所述嵌合受体包含有包含淀粉样蛋白结合区的细胞外结构域,其中所述淀粉样蛋白结合区包含11-1F4抗体片段。

[0208] 在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体从N端到C端包含:包含11-1F4抗体片段的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体从N端到C端包含:VL、接头、VH、间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体从N端到C端包含:N端分泌前导

序列、VL、接头、VH、间隔子、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方案中，VH包含：(a) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-H1、(b) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-H2和(c) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-H3；并且VL包含：(a) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-L1；(b) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR-L2；和(c) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR-L3。在一些实施方案中，细胞质结构域包含细胞质结构域II，如表1中所示。在一些实施方案中，细胞质结构域包含细胞质结构域I和细胞质结构域II，如表1中所示。在一些实施方案中，核酸编码如表1中所示的<sup>11-1F4</sup>CAR<sub>串联</sub>受体。

[0209] 在一些实施方案中，核酸编码包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的嵌合受体。在一些实施方案中，核酸编码嵌合受体，所述嵌合受体包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，核酸编码嵌合受体，所述嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:49的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:49中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0210] 在一些实施方案中，核酸编码包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的嵌合受体。在一些实施方案中，核酸编码嵌合受体，所述嵌合受体包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，核酸编码嵌合受体，所述嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:50的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:50中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0211] 在一些实施方案中，核酸编码包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的嵌合受体。在一些实施方案中，核酸编码嵌合受体，所述嵌合受体包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，核酸编码嵌合受体，所述嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:54的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:54中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

[0212] 在一些实施方案中，核酸编码包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的嵌合受体。在一些实施方案中，核酸编码嵌合受体，所述嵌合受体包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中，核酸编码嵌合受体，所述嵌合受体包含相对于SEQ ID NO:55的氨基酸序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失的氨基酸序列，但保留了作为包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的嵌合受体结合淀粉样蛋白和活化吞噬细胞的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:55中总共有1至15个氨基酸被取代、插入和/或缺失。

#### [0213] B. 载体、宿主细胞

[0214] 在一些实施方案中,本文提供的核酸在一种或多种载体中。例如,在一些实施方案中,本文提供了包含编码嵌合受体的核酸的载体。在一些实施方案中,载体包含编码本公开的嵌合受体的核酸。

[0215] 在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,载体是 $\gamma$ 逆转录病毒载体。在一些实施方案中,载体是慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是腺病毒载体。在一些实施方案中,载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0216] 在一些实施方案中,载体是pEF-ENTR A载体。

[0217] 在一些实施方案中,载体编码多种基因产物。在一些实施方案中,载体是双顺反子载体。在一些实施方案中,载体包含编码第二蛋白产物(例如荧光蛋白,如绿色荧光蛋白(GFP))的核酸。

[0218] 在一些实施方案中,载体是转座酶载体。在一些实施方案中,载体是piggyBac载体。

[0219] 在一些实施方案中,载体包含启动子。在一些实施方案中,编码嵌合受体的核酸可操作地连接至启动子。在一些情况下,启动子是诱导型启动子。在一些实施方案中,启动子是普遍表达的启动子。在一些实施方案中,载体包含EF1-a启动子。在一些实施方案中,编码嵌合受体的核酸可操作地连接至EF1-a启动子。

[0220] 在一些实施方案中,载体包含巨噬细胞特异性调控元件,例如巨噬细胞特异性启动子。在一些实施方案中,编码嵌合受体的核酸可操作地连接至巨噬细胞特异性调控元件。在一些实施方案中,编码嵌合受体的核酸可操作地连接至驱动在巨噬细胞中表达的启动子。

[0221] 本文还提供了包含编码本文所述嵌合受体中的任一种的核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包含有包含编码本公开的嵌合受体的核酸的载体。在一些实施方案中,脊椎动物细胞可用作宿主细胞。例如,适合于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(如例如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利(Sertoli)细胞(如例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);如例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述的TRI细胞;MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系,如Y0、NS0和Sp2/0。对于适合于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

#### [0222] IV. 包含嵌合受体的工程化细胞

[0223] 本文提供了包含本公开的嵌合受体的工程化细胞。在一些实施方案中,提供了包含本文所述嵌合受体中的任一种的工程化细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是吞噬细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞。在一些实施方案

中,工程化细胞是巨噬细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是鼠巨噬细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是RAW264.7细胞(例如,ATCC TIB-71)。在一些实施方案中,工程化细胞是人巨噬细胞。

[0224] 在一些实施方案中,工程化细胞表达本公开的嵌合受体。在一些实施方案中,工程化细胞从编码嵌合受体的核酸(例如,本文所述核酸中的任一种)中表达嵌合受体。在一些实施方案中,工程化细胞从载体(例如,本文所述载体中的任一种)表达嵌合受体。在一些实施方案中,核酸和/或载体被整合到工程化细胞的基因组中。在一些实施方案中,嵌合受体在工程化细胞中瞬时表达。在一些实施方案中,工程化细胞从编码嵌合受体的mRNA表达嵌合受体。在一些实施方案中,工程化细胞在工程化细胞的质膜处包含嵌合受体。

[0225] 在一些实施方案中,细胞获自受试者,并且通过引入本公开的嵌合受体来工程化细胞。受试者的非限制性实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。在一些实施方案中,受试者是人。细胞可获自多种来源,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脾组织、脐带和肿瘤。在某些实施方案中,可使用本领域可用的任何数量的单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或祖细胞系。在某些实施方案中,使用本领域技术人员已知的任意种技术(如Ficoll分离),可从受试者收集的血液单元获得细胞。在一些实施方案中,通过血液成分单采术或白细胞除去法从个体的循环血液中获得细胞。血液成分单采术产物通常包含淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他成核的白细胞、红细胞和血小板。通过血液成分单采术收集的细胞可进行洗涤以去除血浆成分并且将细胞放置在适当的缓冲液或培养基(如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或缺乏钙并且可能缺乏镁,或者可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价的阳离子的洗涤溶液)中以用于后续处理步骤。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物相容性缓冲剂(如不含Ca、不含Mg的PBS)中。或者,可去除血液成分单采术样品中不需要的成分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0226] 在一些实施方案中,通过裂解红细胞并消耗淋巴细胞和红细胞,例如通过PERCOLL™梯度离心,从外周血中分离细胞。或者,可从脐带中分离细胞。在任何情况下,可通过阳性或阴性选择技术进一步分离单核细胞、巨噬细胞和/或树突状细胞的特定亚群。

[0227] 如此分离的细胞可去除表达某些抗原(包括但不限于CD34、CD3、CD4、CD8、CD14、CD19或CD20)的细胞。这些细胞的消耗可使用分离的抗体、包含抗体的生物样品如腹水、结合至物理支持物的抗体和细胞结合的抗体来完成。

[0228] 通过阴性选择富集单核细胞、巨噬细胞和/或树突状细胞群体可使用针对阴性选择细胞独有的表面标志物的抗体组合来完成。在一些实施方案中,富集通过细胞分选和/或经由阴性磁性免疫粘连或流式细胞术的选择来进行,所述阴性磁性免疫粘连或流式细胞术使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。例如,通过阴性选择富集单核细胞、巨噬细胞和/或树突状细胞的细胞群体可以使用单克隆抗体混合物来完成,所述混合物通常包括针对CD34、CD3、CD4、CD8、CD14、CD19或CD20的抗体。

[0229] 在通过阳性选择或阴性选择分离所需细胞群体期间,可改变细胞和表面(例如,颗粒如珠子)的浓度。在某些实施方案中,可能需要显著减少珠子和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度),以确保细胞和珠子的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方案中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方案中,使用1000万个细胞/ml、1500万个细胞/

m1、2000万个细胞/ml、2500万个细胞/ml、3000万个细胞/ml、3500万个细胞/ml、4000万个细胞/ml、4500万个细胞/ml或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方案中,使用7500万个细胞/ml、8000万个细胞/ml、8500万个细胞/ml、9000万个细胞/ml、9500万个细胞/ml或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中,可使用1.25亿个细胞/ml或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度的细胞可导致提高细胞产量、细胞活化和细胞扩增。

[0230] 在一些实施方案中,提供了包含本发明的细胞(例如,工程化的单核细胞、巨噬细胞和/或树突状细胞)的细胞群体。细胞群体的实例包括但不限于衍生自外周血单核细胞、脐带血细胞、纯化的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞群和细胞系的工程化细胞。在另一个实施方案中,外周血单核细胞包括单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞群体。在一些实施方案中,提供了包含工程化单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞群体的纯化细胞群体。

[0231] 在一些实施方案中,工程化细胞具有上调的M1标志物和下调的M2标志物。例如,至少一种M1标志物,如HLA DR、CD86、CD80和PDL1,在工程细胞中上调。在另一个实例中,至少一个M2标志物,如CD206、CD163,在工程化细胞中下调。在一个实施方案中,工程化细胞具有至少一种上调的M1标志物和至少一种下调的M2标志物。

[0232] 在一些实施方案中,工程化细胞是免疫调节细胞。免疫调节细胞包括T细胞,如CD4 T细胞(辅助T细胞)、CD8 T细胞(细胞毒性T细胞,CTL)和记忆T细胞或记忆干细胞T细胞。在另一个实施方案中,T细胞包括自然杀伤T细胞(NK T细胞)。

[0233] 在一个实施方案中,工程化细胞包括自然杀伤细胞。自然杀伤细胞在本领域中是众所周知的。在一个实施方案中,自然杀伤细胞包括细胞系,例如NK-92细胞。NK细胞系的进一步实例包括NKG、YT、NK-YS、HANK-1、YTS细胞和NKL细胞。

[0234] NK细胞介导抗肿瘤作用而没有GvHD的风险,并且相对于T细胞而言寿命短暂。因此,NK细胞在破坏癌细胞后不久将被耗尽,从而减少了在可消除修饰细胞的CAR构建体上对诱导型自杀基因的需求。

[0235] 工程化细胞可获自外周血、脐带血、骨髓、肿瘤浸润淋巴细胞、淋巴结组织或胸腺组织。工程化细胞可包括胎盘细胞、胚胎干细胞,包括诱导型多能干细胞或造血干细胞。工程化细胞可从人、猴子、黑猩猩、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种中获得。工程化细胞可从已建立的细胞系中获得。

[0236] 上述细胞可通过任何已知的手段获得。对于工程化细胞的受体,工程化细胞可以是自体的、同系的、同种异体的或异种的。

[0237] 术语“自体的”是指源自同一个体且后来又再引入到所述个体中的任何材料。术语“同种异体的”是指源自与引入所述材料的个体相同物种的不同动物的任何材料。当一个或多个基因座上的基因不相同,则两个或更多个体被称为彼此同种异体的。在一些方面,来自相同物种的个体的同种异体材料可能在遗传学上足够不同以与抗原性同类物相互作用。

[0238] 在一些实施方案中,工程化细胞中的靶向效应活性通过抑制CD47或SIRP $\alpha$ 活性而增强。CD47和/或SIRP $\alpha$ 活性可以通过用抗CD47或抗SIRP $\alpha$ 抗体处理细胞来抑制。或者,可以通过本领域技术人员已知的任何方法抑制CD47或SIRP $\alpha$ 活性。

[0239] 在一些实施方案中,包含本公开的嵌合受体的工程化细胞与淀粉样蛋白的结合(例如,通过淀粉样蛋白结合区与淀粉样蛋白的结合)促进人淀粉样蛋白原纤维的吞噬作

用。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞调理人淀粉样蛋白原纤维。在一些实施方案中,包含嵌合受体的细胞调理rVλ6W11原纤维。在一些实施方案中,将人淀粉样蛋白原纤维与包含本公开的嵌合受体的工程化细胞接触促进细胞对人淀粉样蛋白原纤维的摄取。在一些实施方案中,将人淀粉样蛋白原纤维与包含本公开的嵌合受体的工程化细胞接触促进人淀粉样蛋白原纤维的调理作用。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞吞噬淀粉样蛋白。

[0240] 本文还提供了产生包含嵌合受体(例如本文所述嵌合受体中的任一种)的工程化细胞的方法CAR表达细胞可以通过使用效应细胞(例如T细胞,具有编码CAR的cDNA)的标准转染或逆转录病毒转导产生。然后将CAR蛋白呈递在细胞质膜上。该分子生物学技术在本领域中是已知的,并且一般与针对肿瘤细胞的CAR-T T淋巴细胞的开发相关(参见,例如, Chavez, J.C. and F.L.Locke, *Best Pract Res Clin Haematol*, 2018. 31 (2) :第135-146页; Cummins, K.D. 和 S.Gill, *Leuk Lymphoma*, 2018. 59 (7) :第1539-1553页; Filley, A.C., 等人, *Front Oncol*, 2018. 8:第453页; Genta, S., 等人, *Expert Opin Biol Ther*, 2018. 18 (4) :第359-367页; Ghione, P., 等人, *Curr Hematol Malig Rep*, 2018. 13 (6) :第494-506页; Guo, Y., 等人, *Protein Cell*, 2018. 9 (6) :第 516-526页)。

[0241] 在一些实施方案中,通过任何已知的手段将包含CAR的多核苷酸(如载体)引入细胞中。在一些实施方案中,使用转染或转导引入多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸是病毒载体。

[0242] 一旦将上述多核苷酸引入细胞以提供工程化细胞,工程化细胞就会扩增。通过任何已知的手段扩增含有上述多核苷酸的工程化细胞。

[0243] 通过任何已知的手段分离扩增的细胞以提供根据本公开的分离的工程化细胞。

[0244] V. 治疗方法, 去除淀粉样蛋白的方法

[0245] 在一些实施方案中,本文提供了用于去除淀粉样蛋白(例如,去除淀粉样蛋白沉积物)的方法。在一些实施方案中,所述方法包括使淀粉样蛋白沉积物与本文所述嵌合受体中的任一种接触。在一些实施方案中,所述方法包括使淀粉样蛋白沉积物与包含本文所述嵌合受体的工程化细胞中的任一种接触。在一些实施方案中,淀粉样蛋白是 AA、AL、AH、ATTR、Aβ<sub>2</sub>M、野生型TTR、AApoAI、AApoAII、AGel、ALys、ALect2、Afib、ACys、ACal、AMedin、AIAPP、APro、AIns、APrP或Aβ。在一些实施方案中,由嵌合受体接触的淀粉样蛋白包括淀粉样蛋白生成性λ6可变结构域蛋白(Vλ6W11)或淀粉样蛋白生成性免疫球蛋白轻链(AL)、Aβ(1-40)淀粉样蛋白样原纤维或淀粉样蛋白生成性Aβ前体蛋白或血清淀粉样蛋白蛋白质A(AA)。在其他实施方案中,由嵌合受体接触的淀粉样蛋白包括以下的淀粉样蛋白生成性形式:免疫球蛋白重链(AH)、β<sub>2</sub>-微球蛋白(Aβ<sub>2</sub>M)、甲状腺素运载蛋白变体(ATTR)、载脂蛋白AI(AApoAI)、载脂蛋白AII(AApoAII)、凝溶胶蛋白(AGel)、溶菌酶(ALys)、白细胞趋化因子(ALect2)、纤维蛋白原α变体(AFib)、胱抑素变体(ACys)、降血钙素((ACal)、乳凝集素(AMed)、胰岛淀粉样蛋白多肽(AIAPP))、催乳素(APro)、胰岛素(AIns)、肌蛋白(APrP); α-突触核蛋白(AαSyn)、tau(ATau)、心房利钠因子(AANF)或IAAP、ALκ4、A1λ1其他淀粉样蛋白生成性肽。由嵌合受体接触的淀粉样肽蛋白生成性肽可以是蛋白质、蛋白质片段或蛋白质结构域。在一些实施方案中,淀粉样蛋白包含重组淀粉样蛋白生成性蛋白。在一些实施方案中,淀粉样蛋白是疾病病理学的一部分。在一些实施方案中,嵌合受体的淀粉样蛋白结合区对淀粉样蛋白

具有结合亲和力。在一些实施方案中,使淀粉样蛋白沉积物与嵌合受体接触导致淀粉样蛋白的至少部分清除。在一些实施方案中,嵌合受体以包含如本文所述的嵌合受体的工程化细胞的形式提供。

[0246] 在其他实施方案中,淀粉样变性是系统性淀粉样变性。在一些实施方案中,淀粉样变性是家族性淀粉样变性。在其他实施方案中,淀粉样变性是散发性淀粉样变性。在一些实施方案中,淀粉样变性或淀粉样蛋白相关疾病是II型糖尿病、阿尔茨海默氏病、唐氏综合征、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变性、脑 $\beta$ -淀粉样蛋白血管病、海绵状脑病、甲状腺肿瘤、帕金森氏病、路易体痴呆、tau蛋白病、亨廷顿氏病、老年性系统性淀粉样变性、家族性血液透析、老年性系统性衰老、垂体老化障碍、医源性综合征、海绵状脑病、反应性慢性炎症、甲状腺肿瘤、骨髓瘤或其他形式的癌症的AA淀粉样变性、AL淀粉样变性、AH淀粉样变性、A $\beta$ 淀粉样变性、ATTR淀粉样变性、ALect2 淀粉样变性和IAPP淀粉样变性。

[0247] 本文还提供了治疗受试者的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述嵌合受体中的任一种。在一些实施方案中,施用包含嵌合受体的细胞(例如吞噬细胞)。在一些实施方案中,施用包含嵌合受体的巨噬细胞。在一些实施方案中,施用包含嵌合受体的单核细胞。

[0248] 在某些示例性实施方案中,本文提供了治疗患有淀粉样变性的受试者的方法。例如,将有效量的包含如本文所述的嵌合受体的细胞施用于受试者,从而治疗受试者或允许淀粉样蛋白沉积物的成像。在某些示例性方面,提供了一种用于清除受试者体内淀粉样蛋白沉积物的方法。所述方法包括,例如,选择患有淀粉样变性的受试者并向所述受试者施用有效量的包含如本文所述的嵌合受体的工程化细胞。包含嵌合受体的工程化细胞包括,例如,包含嵌合受体的工程化细胞,所述嵌合受体包含淀粉样蛋白结合肽或其功能片段,或包含嵌合受体的工程化细胞,所述嵌合受体包含衍生自结合淀粉样蛋白的抗体的淀粉样蛋白结合区。施用包含嵌合受体的工程化细胞从而导致淀粉样蛋白的清除并因此导致受试者的治疗。

[0249] 在一些实施方案中,治疗患有淀粉样变性的受试者的方法和/或去除淀粉样变性的方法包括向有此需要的受试者(例如患有淀粉样变性的人)施用一剂量的包含嵌合受体的工程化细胞。在一些实施方案中,施用治疗有效剂量的包含嵌合受体的工程化细胞。

[0250] 在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞作为(a) 单次输注或(b) 多次输注(例如,单剂量分成多次输注)施用。

[0251] 在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含约  $10^4$ 至约 $10^9$ 个细胞/kg,例如约 $10^4$ 至约 $10^5$ 个细胞/kg,约 $10^5$ 至约  $10^6$ 个细胞/kg,约 $10^6$ 至约 $10^7$ 个细胞/kg,约 $10^7$ 至约 $10^8$ 个细胞/kg,或约 $10^8$ 至约 $10^9$ 个细胞/kg。在实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含约 $0.6 \times 10^6$ 个细胞/kg至约 $2 \times 10^7$ 个细胞/kg。在特定实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含约 $2 \times 10^5$ 个细胞 /kg、 $1 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $1.1 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $2 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $3 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $3.6 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $1 \times 10^7$ 个细胞/kg、 $1.8 \times 10^7$ 个细胞/kg、 $2 \times 10^7$ 个细胞/kg、 $5 \times 10^7$ 个细胞/kg、 $1 \times 10^8$ 个细胞 /kg、 $2 \times 10^8$ 个细胞/kg、 $3 \times 10^8$ 个细胞/kg或 $5 \times 10^8$ 个细胞/kg。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含约 $1 \times 10^6$ 个细胞 /kg、 $1.1 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $2 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $3.6 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $1 \times 10^7$ 个细胞/kg、 $1.8 \times 10^7$ 个细胞/kg、 $2 \times 10^7$ 个细胞/kg、 $5 \times 10^7$ 个细胞/kg、 $1 \times 10^8$ 个细胞 /kg、 $2 \times 10^8$ 个细胞/kg、 $3 \times 10^8$ 个细胞/kg 或 $5 \times 10^8$ 个细胞/

kg。

[0252] 在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含约  $1 \times 10^6$  个细胞/kg、 $1.1 \times 10^6$  个细胞/kg、 $2 \times 10^6$  个细胞/kg、 $3.6 \times 10^6$  个细胞/kg、 $5 \times 10^6$  个细胞/kg、 $1 \times 10^7$  个细胞/kg、 $1.8 \times 10^7$  个细胞/kg、 $2 \times 10^7$  个细胞/kg、 $5 \times 10^7$  个细胞/kg、 $1 \times 10^8$  个细胞/kg、 $2 \times 10^8$  个细胞/kg 或  $5 \times 10^8$  个细胞/kg。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含至少约  $1 \times 10^6$  个细胞/kg、 $1.1 \times 10^6$  个细胞/kg、 $2 \times 10^6$  个细胞/kg、 $3.6 \times 10^6$  个细胞/kg、 $5 \times 10^6$  个细胞/kg、 $1 \times 10^7$  个细胞/kg、 $1.8 \times 10^7$  个细胞/kg、 $2 \times 10^7$  个细胞/kg、 $5 \times 10^7$  个细胞/kg、 $1 \times 10^8$  个细胞/kg、 $2 \times 10^8$  个细胞/kg 或  $5 \times 10^8$  个细胞/kg。在特定实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含最多约  $1 \times 10^6$  个细胞/kg、 $1.1 \times 10^6$  个细胞/kg、 $2 \times 10^6$  个细胞/kg、 $3.6 \times 10^6$  个细胞/kg、 $5 \times 10^6$  个细胞/kg、 $1 \times 10^7$  个细胞/kg、 $1.8 \times 10^7$  个细胞/kg、 $2 \times 10^7$  个细胞/kg、 $5 \times 10^7$  个细胞/kg、 $1 \times 10^8$  个细胞/kg、 $2 \times 10^8$  个细胞/kg 或  $5 \times 10^8$  个细胞/kg。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含约  $1.1 \times 10^6$  -  $1.8 \times 10^7$  个细胞/kg。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含约  $1 \times 10^7$  个细胞、 $2 \times 10^7$  个细胞、 $5 \times 10^7$  个细胞、 $1 \times 10^8$  个细胞、 $2 \times 10^8$  个细胞、 $5 \times 10^8$  个细胞、 $1 \times 10^9$  个细胞、 $2 \times 10^9$  个细胞或  $5 \times 10^9$  个细胞。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含至少约  $1 \times 10^7$  个细胞、 $2 \times 10^7$  个细胞、 $5 \times 10^7$  个细胞、 $1 \times 10^8$  个细胞、 $2 \times 10^8$  个细胞、 $5 \times 10^8$  个细胞、 $1 \times 10^9$  个细胞、 $2 \times 10^9$  个细胞或  $5 \times 10^9$  个细胞。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞的剂量包含最多约  $1 \times 10^7$  个细胞、 $2 \times 10^7$  个细胞、 $5 \times 10^7$  个细胞、 $1 \times 10^8$  个细胞、 $2 \times 10^8$  个细胞、 $5 \times 10^8$  个细胞、 $1 \times 10^9$  个细胞、 $2 \times 10^9$  个细胞或  $5 \times 10^9$  个细胞。

[0253] 可以通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术来施用包含嵌合受体的工程化细胞(参见,例如,Rosenberg等人,New Eng. J. of Med. 319:1676,1988)。在一些实施方案中,可以以任何方便的方式向受试者施用包含嵌合受体的工程化细胞,包括通过气雾剂吸入、注射、摄取、输液、植入或移植。本文所述的组合物可以经动脉、皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用于患者。在一个方面,将包含嵌合受体的工程化细胞通过皮内或皮下注射施用于患者。在一个方面,将包含本发明的嵌合受体的工程化细胞通过通过i.v.注射施用。可以将包含嵌合受体的细胞组合物直接注射到疾病部位,例如体内具有淀粉样蛋白沉积物的部位。

[0254] 在一些实施方案中,将嵌合受体引入细胞(例如,巨噬细胞)中,并且受试者(例如,人)接受包含嵌合受体的工程化细胞的初次施用,以及包含嵌合受体的工程化细胞的一次或多次后续施用,其中所述一次或多次后续施用在之前施用后少于15天,例如14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天后施用。在一些实施方案中,每周向受试者施用包含嵌合受体的工程化细胞的多于一次施用,例如每周施用包含嵌合受体的工程化细胞的2次、3次或4次施用。在一些实施方案中,受试者接受包含嵌合受体的工程化细胞的每周多于一次施用(例如,每周2次、3次或4次施用)(在本文中也称为“周期”),接着是一周没有包含嵌合受体的工程化细胞的施用,并且然后向受试者施用包含嵌合受体的工程化细胞的一次或多次额外施用(例如,包含嵌合受体的工程化细胞的每周多于一次施用)。在一些实施方案中,受试者接受多于一个周期的包含嵌合受体的工程化细胞,并且每个周期之间的时间少于10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天或3天。在一些实施方案中,每隔一天施用包含嵌合受体的工程化细胞,每周施用3次。在一些实施方案中,施用包含嵌合受

体的工程化细胞持续至少两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周或更多周。

[0255] 在一些实施方案中,包含嵌合受体的细胞结合个体中的淀粉样蛋白沉积物。在一些实施方案中,淀粉样蛋白沉积物可能有助于疾病的病理学。在其他实施方案中,淀粉样蛋白沉积物可以指示个体中的淀粉样变性或淀粉样蛋白相关疾病。在一些实施方案中,包含嵌合受体的细胞结合至患有淀粉样变性的个体中的淀粉样蛋白。在一些实施方案中,淀粉样变性定位于特定组织或器官系统,如肝脏、心脏或中枢神经系统。在其他实施方案中,淀粉样变性是系统性淀粉样变性。在一些实施方案中,淀粉样变性是家族性淀粉样变性。在其他实施方案中,淀粉样变性是散发性淀粉样变性。在一些实施方案中,淀粉样变性或淀粉样蛋白相关疾病是II型糖尿病、阿尔茨海默氏病、唐氏综合征、荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变性、脑 $\beta$ -淀粉样蛋白血管病、海绵状脑病、甲状腺肿瘤、帕金森氏病、路易体痴呆、tau蛋白病、亨廷顿氏病、老年性系统性淀粉样变性、家族性血液透析、老年性系统性衰老、垂体老化障碍、医源性综合征、海绵状脑病、反应性慢性炎症、甲状腺肿瘤、骨髓瘤或其他形式的癌症的AA淀粉样变性、AL 淀粉样变性、AH淀粉样变性、AB淀粉样变性、ATTR淀粉样变性、ALect2淀粉样变性和IAPP淀粉样变性。在一些实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞结合至与正常衰老相关的淀粉样蛋白。在其他实施方案中,包含嵌合受体的工程化细胞用于受试者的淀粉样变性或淀粉样蛋白相关疾病的诊断、治疗或预后。

[0256] 在某些示例性实施方案中,提供了一种用于诊断和治疗患有淀粉样变性的受试者的方法。此类方法包括向受试者施用可检测地标记的包含嵌合受体的工程化细胞,并且基于施用标记的工程化细胞,确定所述受试者患有淀粉样变性。然后可向受试者施用有效量的淀粉样蛋白治疗。例如,可施用有效量的一种或多种包含嵌合受体的工程化细胞。

[0257] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,如灵长类动物、牛、啮齿动物或猪。在一些实施方案中,受试者是人。

[0258] 实施方案

[0259] 嵌合受体、核酸、载体、宿主细胞、包含嵌合受体的工程化细胞和本文提供的方法的各种实施方案包括在以下实施方案的非限制性列表中。

[0260] 实施方案1.一种嵌合受体,所述嵌合受体包含:

[0261] 细胞质结构域,其中所述细胞质结构域包含受体的信号传导结构域,所述信号传导结构域在被活化时活化巨噬细胞;

[0262] 跨膜结构域;和

[0263] 细胞外结构域,其中所述细胞外结构域包含淀粉样蛋白结合区。

[0264] 实施方案2.如实施方案1所述的嵌合受体,其中所述淀粉样蛋白结合区包含如表A中列出的淀粉样蛋白结合肽或其功能片段。

[0265] 实施方案3.如实施方案2所述的嵌合受体,其中所述淀粉样蛋白结合肽或其功能片段直接或间接地连接至CH2结构域或其片段。

[0266] 实施方案4.如实施方案3所述的嵌合受体,其中所述CH2结构域或其片段包含与表2或表3中列出的CH2结构域序列具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0267] 实施方案5.如实施方案1所述的嵌合受体,其中所述淀粉样蛋白结合区包含11-1F4抗体片段。

[0268] 实施方案6.如实施方案5所述的嵌合受体,其中所述11-1F4抗体片段包含与表1中列出的11-1F4 VL序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0269] 实施方案7.如实施方案5或6所述的嵌合受体,其中所述11-1F4 抗体片段是人源化的。

[0270] 实施方案8.如实施方案1-7中任一项所述的嵌合受体,其中所述细胞质结构域包含细胞质结构域I、细胞质结构域II或其功能片段。

[0271] 实施方案9.如实施方案8所述的嵌合受体,其中所述细胞质结构域包含与表1或表3中列出的细胞质结构域I或细胞质结构域II 的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0272] 实施方案10.如实施方案1-9中任一项所述的嵌合受体,其中淀粉样蛋白与细胞外结构域的结合活化了嵌合受体的细胞质结构域。

[0273] 实施方案11.一种用于去除淀粉样蛋白的方法,其包括使淀粉样蛋白沉积物与如实施方案1-10中任一项的所述嵌合受体接触。

[0274] 实施方案12.如实施方案11所述的方法,其中所述淀粉样蛋白是AA、AL、AH、ATTR、A $\beta$ 2M、野生型TTR、AApoAI、AApoAII、AGel、ALys、ALect2、Afib、ACys、ACal、AMedin、AIAPP、APro、AIns、APrP或A $\beta$ 。

[0275] 实施方案13.如实施方案12所述的方法,其中所述嵌合受体的淀粉样蛋白结合区对所述淀粉样蛋白具有结合亲和力。

[0276] 实施方案14.如实施方案11-13中任一项所述的方法,其中使所述淀粉样蛋白沉积物与所述嵌合受体接触导致所述淀粉样蛋白的至少部分清除。

[0277] 实施方案15.一种治疗受试者的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案1-10中任一项所述的嵌合受体。

[0278] 实施方案16.如实施方案15所述的方法,其中向所述受试者施用所述嵌合受体包括施用表达所述嵌合受体的巨噬细胞或单核细胞。

[0279] 实施方案17.如实施方案1所述的嵌合受体或如实施方案11-16 中任一项所述的方法,其中所述受体与表3中作为CAR-P构建体 -345aa列出的序列具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性,具有或不具有分泌前导序列。

[0280] 实施方案18.如实施方案1所述的嵌合受体或实施方案11-16中任一项所述的方法,其中所述受体的每个组分一起或单独地与表3中作为CAR-P构建体-345aa的对应组分具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性。

[0281] 实施例

[0282] 以下实施例进一步说明本发明,但不应解释为以任何方式限制其范围。鉴于本公开内容和本领域技术人员的一般技能水平,技术人员将理解以下实施例仅意图是示例性的,并且在不脱离目前公开的主题的范围的情况下可采用多种变化、修改和改变。附图旨在被视为本公开的说明书和描述的整体部分。

[0283] 如本文所用,应用以下缩写:ATTR(年龄依赖性甲状腺素运载蛋白相关);AL(淀粉样变性);CAR(嵌合抗原受体);CAR-P(嵌合抗原受体-吞噬);ELISA(酶联免疫吸附测定);FcR(Fc受体);mAb(单克隆抗体);mos(月);M $\phi$ (巨噬细胞);SAP(血清淀粉样蛋白P);SC

(皮下);和scFv(单链可变片段)。

[0284] 实施例1.AL淀粉样变性受体

[0285] 以下实施例描述了衍生自淀粉样蛋白反应性单克隆抗体11-1F4 和淀粉样蛋白靶向肽的淀粉样蛋白结合区。

[0286] 11-1F4单克隆抗体

[0287] 已产生淀粉样蛋白反应性单克隆抗体 (mAb) 11-1F4,并将其表征为治疗剂 (Hrncic,R.,等人,Am J Pathol,2000.157(4):第1239-46页; O'Nuallain,B.,等人, Amyloid and Amyloidosis:Proceedings of the Xth International Symposium on Amyloidosis.2005.Tours,France:CRC Press;O'Nuallain,B.,等人,Biochemistry, 2007.46(5):第1240-7页; Wall,J.S.,等人,J Nucl Med,2006.47(12):第2016-2024页)。mAb结合存在于AL淀粉样蛋白原纤维上的新表位,但不强烈结合存在于 AL患者循环中的非纤维状LC蛋白。通过小动物SPECT/CT成像很容易证明在免疫受损小鼠的皮下(SC)植入的11-1F4与人AL淀粉样蛋白提取物的反应性(图4A;Wall,J.S.,等人,J Nucl Med,2006.47(12):第2016-202页)。在不含淀粉样蛋白的组织中未观察到脱靶结合。在需要募集吞噬性M $\phi$ 和嗜中性粒细胞的过程中,用11-1F4(5mg/Kg) 治疗携带SC人AL淀粉样蛋白瘤的小鼠加快了团块的溶解(图4B、图4C)(Hrncic,R.,等人,Am J Pathol,2000.157(4):第1239-46页; O'Nuallain,B.,等人,Amyloid and Amyloidosis:Proceedings of the Xth International Symposium on Amyloidosis.2005.Tours,France:CRC Press;Solomon,A.,D.T.Weiss,和J.S.Wall,Clin Cancer Res,2003. 9(10Pt 2):第3831S-8S页)。进行了首次人体生物分布研究(NCT01409148),通过PET/CT成像显示了放射性碘化的11-1F4在AL患者的某些淀粉样蛋白负荷的器官中特异性累积(图4D;Wall,J.S., 等人,Blood, 2010.116(13):第2241-4页)。

[0288] 这些数据表明,11-1F4能够特异性靶向患者的AL淀粉样蛋白,并且在小鼠中,mAb的结合可促进M $\phi$ 介导的人淀粉样蛋白溶解。确定了鼠11-1F4重链和轻链可变结构域(Fv区)的氨基酸序列,并用于生成嵌合试剂(使用人IgG1)。c11-1F4现已经历用于AL淀粉样变性患者的安全性和功效的1期临床评价(NCT02245867)。中期数据表明,用c11-1F4 mAb治疗的耐受性良好,并引起了AL淀粉样变性患者的心脏和肾脏相关生物标志物的改善(Edwards,C.V.,等人, Amyloid,2017.24(增刊1):第58-59页)。

[0289] 淀粉样蛋白靶向肽

[0290] 在过去7年中,已经产生并表征了一系列合成的淀粉样蛋白反应性肽,主要用作系统性淀粉样变性的新型成像剂(Martin,E.B.,等人, Sci Rep,2016.6:第22695页;Wall,J.S.,等人,Molecules,2015.20(5):第7657-82页;Martin,E.B.,等人,Peptides, 2014.60:第63-70页; Wall,J.S.,等人,Mol Imaging,2017.16:第1536012117708705页; Wall,J.S.,等人,Mol Imaging Biol,2012.14(4):第402-7页)。最初,鉴定了一种称为p5的肽:31个氨基酸、非天然、多元(+8)试剂,能够结合合成的AL淀粉样蛋白原纤维以及人AL和ATTR淀粉样蛋白提取物(Martin,E.B.,等人,Biochem Biophys Res Commun,2013.436(1):第85-9页;Wall,J.S.,等人,Proc Natl Acad Sci U S A,2011.108(34):第E586-94页)。随后,产生了具有增加的净正电荷的p5衍生物(肽 p5+14),它类似地结合AL和ATTR相关的淀粉样蛋白,但具有更高的亲和力和亲合力(Martin,E.B.,等人,Sci Rep,2016.6:第22695

页; Wall, J.S., 等人, *Molecules*, 2015.20 (5): 第7657-82页)。

[0291] 鉴于p5+14的增强特性,该肽已被广泛表征,其目标是将放射性标记的变体作为一种用于系统性淀粉样变性成像的新型剂转化至临床。使用示例性原纤维结构A $\beta$  (PDB#1BEG)作为底物的分子动力学模拟表明,p5+14-原纤维相互作用由涉及12个赖氨酸氨基酸侧链的多价静电相互作用主导,其可以与淀粉样蛋白原纤维重复的蛋白质亚基相互作用。此外,赖氨酸残基可以结合淀粉样蛋白沉积物中普遍存在的超硫酸化硫酸乙酰肝素糖胺聚糖 (Wall, J.S., 等人, *Molecules*, 2015.20 (5): 第7657-82页)。当生物素化时,肽p5+14特异性结合在福尔马林固定石蜡包埋的组织切片中的人AL淀粉样蛋白沉积物,这由刚果红染色组织切片中的绿金双折射证明(图5A)。

[0292] 基于p5+14良好的淀粉样蛋白结合和成像能力(即与淀粉样蛋白特异性结合并且与健康器官和组织无反应性),以及优异的临床前安全性特征,美国FDA批准了一项研究性新药申请(IND#132282)以在系统性淀粉样变性患者中进行碘<sup>124</sup>标记的p5+14肽的1期PET/CT 成像试验(NCT03678259)。田纳西大学医学中心(the University of Tennessee Medical Center)于2018年11月开始了首次人体成像研究,以评价<sup>124</sup>I-p5+14肽的安全性和淀粉样蛋白反应性。来自AL淀粉样变性患者的初步数据表明该肽定位至这名受试者中可能含有淀粉样蛋白的器官(图5B)。

[0293] 随着肽p5+14作为淀粉样变性成像剂成功转化为临床评价,假设该肽(或其他p5衍生物)(Wall, J.S., 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018.115 (46): 第E10839-E10848页; Wall, J.S., 等人, *Mol Imaging Biol*, 2017.19 (5): 第714-722页; Martin, E.B., 等人, *J Transl Med*, 2017.15 (1): 第247页)可进一步开发用作新型淀粉样蛋白疗法的组分。

[0294] 因此,如本文所述,该肽用作CAR的结合受体组分,其在淀粉样蛋白存在下特异性靶向并活化M $\phi$ ,导致吞噬作用。

[0295] 实施例2.用于淀粉样蛋白吞噬作用的CAR设计

[0296] 以下实施例描述了由淀粉样蛋白结合区组成的CAR构建体的设计。

[0297] 在CAR-P细胞的一次迭代中,建议使用以单链可变片段(scFv)形式存在的淀粉样蛋白结合mAb 11-1F4作为淀粉样蛋白结合受体,因为已显示scFv结构在CAR设置中具有活性(Morrissey, M.A., 等人, *Elife*, 2018.7)。<sup>124</sup>I-11-1F4的成像试验表明mAb仅对约60%的AL患者成像(Wall, J.S., 等人, *Blood*, 2010.116 (13): 第2241-4页)。因此,为了创建更通用的CAR结构,第二个CAR-P设计采用多淀粉样蛋白反应性肽作为结合受体的用途(见下文)。这是一种新型方法,因为大多数CAR构建体使用mAb相关的scFv作为受体。鉴于对肿瘤(Le Joncour, V. and P. Laakkonen, *Bioorg Med Chem*, 2018.26 (10): 第 2797-2806页)和淀粉样蛋白靶向肽(Wall, J.S., 等人, *Molecules*, 2015. 20 (5): 第7657-82页; Wall, J.S., 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. 115 (46): 第E10839-E10848页; Wall, J.S., 等人, *PLoS One*, 2013.8 (6): 第e66181页; Wall, J.S., 等人, *Mol Imaging Biol*, 2017.19 (5): 第 714-722页)的越来越多的利用,据信这种方法可能为构建CAR表达细胞开辟新途径,并通过提高生活质量和延长患者生存期为患者提供有意义的益处。

[0298] 为初步研究设计了六种构建体。三个CAR掺入了11-1F4 scFv 作为淀粉样蛋白结合受体,并且细胞质结构域将包含:(i)高亲和力鼠 FcR共有 $\gamma$ 亚基;(ii)鼠CD19+FcR(串联),或;(iii)无信号转导结构域(其将用作阴性对照)(图6,图(i))。举例来说,构成具有串

联 (CD19+FcR) 细胞质结构域的11-1F4 scFv CAR的模块(称为 11-1F4CAR<sub>串联</sub>)的氨基酸显示在表1中。跨膜结构域和细胞质结构域与之前的CAR-PMφ研究中使用的相同 (Morrissey, M.A., 等人, Elife, 2018.7)。

[0299] 表1. <sup>11-1F4</sup>CAR<sub>串联</sub>组分的一级结构(单字母氨基酸代码)。

11-1F4 <sup>+</sup> CAR 串联			
结构域	一级结构(氨基酸)	SEQ ID NO	备注
前导子	MASPLTRFLS LNLLLLGESI ILGSGEA	28	残基 1-27 小鼠 CD8 $\alpha$ 链 (UniProtKB - P01731 [CD8A_小鼠])
11-1F4 VL	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISYRASKSVS TSGYSYMHWN QQKPGQPPRL LIYLVSNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHIRELTR FGGGTKLEIK R	19	11-1F4, 氨基酸 1-111
scFv 接头	GGSSRSSSSGG GSGGGG	27	参见 Andris-Widhopf, J., 等人, <i>Cold Spring Harb Protoc</i> , 2011. 2011(9).
[0300] 11-1F4 VH	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLs SYGVSWVRQP PGKGLEWLGV IWGDGSTNYH PNLMSRSLSI SKDISKSQVL FKLNSLQTDD TATYYCVTLD YWGQGTSTVTV S	20	11-1F4, 氨基酸 1-111
间隔子-跨膜结构域	KVNSTTTKPVL RTPSPVHPTGT SQPQRPEDCRP RGSVKGTGLDF ACDIYIWAPLA GICVALLSLI ITLIC	29	残基 148-218 小鼠 CD8 $\alpha$ 链 (UniProtKB - P01731 [CD8A_小鼠])
细胞质结构域 I	AESYENADEE LAQPVGRMMD FLSPHGSARD PSRE	30	残基 500 -534 小鼠 CD19 (UniProtKB - P25918 [CD19_小鼠])
细胞质结构域 II	GEPQLCYILDA VFLYGIIVLTL LYCRLKIQVRK AAIASREKADA VYTGLNTRSQE TYETLKHEKPP Q	31	残基 19-86 小鼠 Fc ERG 前体 (UniProtKB - P20491 [FCERG_小鼠])

[0301] 第二组的三个CAR掺入了p5+14肽作为淀粉样蛋白受体,并且将类似地使用三个不同的细胞质信号结构域(图6,图(ii))。每个模块的蛋白质序列已从用于生成CAR的蛋白质

序列数据库(例如UniProt) 中鉴定出来。

[0302] 对于具有p5+14的CAR构建体,鼠CH2结构域(来自IgG2a Fc 结构域)被包含在紧邻肽的远端(C端),以使其位于远离细胞表面。据信这对于最小化带高正电荷的p5+14肽与质膜组分的相互作用是必要的,特别是具有高负电荷密度的糖胺聚糖。选择鼠IgG2a Fc CH2结构域是因为先前生成了Fc2a肽融合试剂,其中淀粉样蛋白反应性肽与CH2结构域融合。在这种配置中,淀粉样蛋白反应性肽保留了其结合AL淀粉样蛋白和合成的淀粉样蛋白样AL原纤维的能力(Foster, J.S., 等人, *Front Immunol*, 2017. 8: 第1082页)。肽p5+14和鼠Fc2a CH2的序列如表2中所示。

[0303] 表2. p5+14的一级结构和<sup>p5+14</sup>CAR构建体中使用的CH2结构域。

p5+14CAR <sub>FcR</sub>			
结构域	一级结构(氨基酸)	SEQ ID NO	备注
p5+14-间隔子	ISAMQVTPTV GGGYSKAQKA QAKQAKQAQK AQKAQAKQAK QAQKAQKAQA KQAKQVTPTV	32	参见 Wall, J.S., 等人, <i>Molecules</i> , 2015. 20(5): 第 7657-82 页。
[0304] CH2	PNLLGGPSVF IFPPKIKDVL MISLSPIVTC VVVDVSEDDP DVQISWVFN VEVHTAQTQT HREDYNSTLR VVSALPIQH DWMSGKEFKC KVNNKDL IERTISKPK	33	来自自 pFUSE-mIgG2A-Fc2 的表达载体 (Invivogen, San Diego, CA)

[0305] 值得注意的是,CH2结构域可被任何其他相容序列取代以实现相同的目标。类似地,可采用许多细胞质吞噬作用信号传导结构域:尽管其他受体也可以参与,但Mφ具有四个具有不同细胞质元件的标准吞噬受体(Taylor, P.R., 等人, *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: 第901-44 页)。一般来说,通过免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)元件的信号转导被认为是吞噬作用过程的主要组分,并且这些元件可以单独使用,也可以与其他元件组合使用(Hamerman, J.A., 等人, *Immunol Rev*, 2009. 232 (1): 第42-58页; Taylor, P.R., 等人, *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: 第901-44页)。还值得注意的是, Mφ的共刺激和吞噬作用的诱导可能通过表面结合模式识别Toll样受体2的相互作用发生,所述Toll样受体2已显示出结合淀粉样蛋白原纤维(Friedland, R.P., *J Alzheimers Dis*, 2015. 45 (2): 第349-62页; Tukul, C., 等人, *Cell Host Microbe*, 2009. 6 (1): 第45-53页)。

[0306] 实施例3. CAR在巨噬细胞系中的表达

[0307] 以下实施例描述了上述实施例2中所述的CAR构建体在巨噬细胞系中的表达。

[0308] 编码整个CAR的cDNA序列由Genscript (Piscataway, NJ) 合成,克隆到pEF-ENTRA

(Addgene)载体中,并重组到pLenti CMV GFP Dest (Addgene)中,通过使用具有VSV-G假型的第3代包装系统转染到HEK293T细胞中包装为慢病毒。这种双顺反子目标载体包括绿色荧光蛋白(GFP)序列,以允许识别阳性转染的细胞。用慢病毒转导鼠吞噬性M $\phi$ 细胞系RAW264.7(RAW;ATCC TIB-71)以稳定掺入,然后进行有限稀释克隆。除了RAW细胞系之外,还转导了非吞噬性鼠单核细胞细胞系WEHI-274.1(WEHI;ATCC CRL-1679)。有理由认为,由于鼠RAWM $\phi$ ,即使是缺乏CAR的那些,也会表现出基础水平的淀粉样蛋白吞噬作用,因此WEHI-274细胞用作阴性对照细胞,以研究在不存在吞噬作用的情况下淀粉样蛋白与CAR的结合。作为最终对照,表达GFP的RAW和WEHI细胞是通过用pLenti CMV GFP Dest 或仅含有GFP的另一种载体转染或转导产生的。11-1F4 scFv或p5+14 肽CAR的表面表达通过标准免疫荧光(Alexa-594)对具有11-1F4抗独特型或之前产生的p5+14反应性mAb的固定细胞进行验证(Wall,J.S.,等人,Pharm Pat Anal,2017.6(5):第215-223页)。通过细胞表面流式细胞术(Qu,C.X.,等人,J Clin Lab Anal,2006.20(6):第250-4页)或放射性标记的抗体结合测定(Dahle,J.,等人,Nucl Med Commun,2007. 28(9):第742-7页)使用11-1F4抗独特型和抗肽p5+14抗体来评估每个细胞中表达的受体的数量。

#### [0309] 实施例4.合成的AL原纤维和淀粉样蛋白提取物与CAR-P M $\phi$ 的结合

[0310] 作为功能性研究中的第一步,进行RAW和WEHI细胞转导,通过GFP相关绿色荧光的表达来证明,并通过有限稀释克隆,以研究合成的AL相关淀粉样蛋白原纤维(Wall,J.,等人,Biochemistry,1999. 38(42):第14101-8页)和人AL淀粉样蛋白提取物的细胞表面结合。使用琥珀酰亚胺-AlexaFluor-594(最大荧光发射= $\sim$ 610nm; ThermoFisher)标记淀粉样蛋白,并与CAR-P M $\phi$ 孵育1-3小时,然后通过流式细胞术对与淀粉样蛋白材料相关的细胞进行定量。通过首先使用前向和侧向散射参数对完整细胞进行门控,然后对GFP进行门控(使用488nm处的激发以及用532nm滤光器检测发射),使用Attune NxT声聚焦细胞仪(Applied Biosystems,Carlsbad,CA)获取数据。对 AlexaFluor-594(574nm滤光器)也呈阳性的GFP阳性细胞的数量可作为结合效率的度量。本研究评估了表面表达的11-1F4 scFv和p5+14 肽的完整性及其结合淀粉样蛋白的能力。缺乏CAR表达的RAW和 WEHI细胞用作对照群体。通过使用非配对T检验或非参数等效方案(如果数据不正态分布)对使用CAR-P阳性细胞和对照细胞的n=5的实验数据进行比较。

#### [0311] 实施例5.AL淀粉样蛋白的离体吞噬作用

[0312] 合成的淀粉样蛋白原纤维和人AL淀粉样蛋白提取物的吞噬作用最初是通过荧光显微镜使用已用pH敏感荧光团pHrodo红(最大发射= $\sim$ 600nm)标记的淀粉样蛋白材料进行研究的。该试剂已被广泛用于研究细菌和近来的淀粉样蛋白原纤维(Richey等人(2019) Am J. Pathol.已接收)进入M $\phi$ 的酸化吞噬溶酶体的吸收,其中荧光团的荧光发射大大增强(Miksa,M.,等人,J Immunol Methods,2009.342(1-2):第71-7页)。CAR表达RAW细胞在RPMI培养基中生长并以每孔 $5 \times 10^5$ 个细胞接种于24孔培养皿中,直到它们半汇合。将荧光团缀合的AL淀粉样蛋白添加到孔中,至最终浓度为25-50 $\mu$ g/mL,最终体积为1-mL。预计淀粉样蛋白物质是不溶的并迅速沉降到孔底部。在2-24小时的孵育期后,用升温的RPMI清洗孔并准备进行分析。使用 Keyence Bz-x700荧光显微镜(40倍物镜和3倍数码变焦)获得双荧光团(红色和绿色)的显微照片。对含有红色荧光的淀粉样蛋白颗粒的 CAR-P阳性(绿色)

细胞的数量进行量化并使用非配对的双尾t检验或非参数等效与CAR-P阴性细胞进行比较。

[0313] 平行地,使用从培养皿中取出的悬浮液中的细胞进行流式细胞术分析(如以上实施例3中所述)。量化同时出现的红色(pHrodo red)和绿色(GFP阳性)细胞的数量,并与CAR阴性、表达GFP的对照RAW 和WEHI细胞进行比较。

[0314] 实施例6.淀粉样蛋白-CAR-P **M $\phi$** 在携带AL淀粉样蛋白的小鼠中的体内表征

[0315] 人AL淀粉样蛋白提取物用近红外染料DyLight800-NHS酯(最大发射=794nm;Life Technologies)和用于光学成像的pHrodo red (iBox Scientia,Analytik Jena)进行标记。通过IP注射约2-20mg荧光团缀合的淀粉样蛋白,在雄性和雌性免疫功能低下的(NU/NU)小鼠(每个队列n=5)中诱导局部AL团块。注射后一周,小鼠接受IP注射500 $\mu$ L体积无菌PBS中的 $1 \times 10^6$ GFP阳性CAR-P RAW或CAR-P WEHI **M $\phi$** (或,作为对照,GFP阳性、CAR阴性的细胞)。在注射后第1、3、4和7天,通过对麻醉(1.5%异氟醚)的小鼠的光学成像可视化注射的**M $\phi$** 与淀粉样蛋白的共定位和吞噬作用(Wall,J.S.,等人, Proc Natl Acad Sci U S A, 2018.115(46):第E10839-E10848页)。从数字图像中量化每个荧光团(GFP、pHrodo red和DyLight800)的荧光强度。在淀粉样蛋白靶向实验结束时,死后收集残留的淀粉样蛋白物质以及肝脏、脾脏、肺和肾脏,固定在福尔马林中,并制备组织切片并通过荧光显微术评价以辨别GFP阳性**M $\phi$** 的整体生物分布。通过荧光显微照片的形态计量分析,在至少5个连续的6 $\mu$ m厚的组织切片中量化了**M $\phi$** 的存在。使用非配对的双尾t检验对来自接受CAR-P**M $\phi$** 与对照细胞的小鼠的数据进行比较。

[0316] 实施例7.示例性CAR构建体

[0317] 下面的表3提供了示例性的间隔子、跨膜、细胞质区、CH2、前导子、p5和全长CAR-P的氨基酸序列。

[0318] 表3.CAR构建体氨基酸序列.

[0319]

<b>间隔子/跨膜</b>	
<b>小鼠(SEQ ID NO:29)</b>	
150	
KVN	
	160 170
180 190 200	
STTTKPVLR T PSPVHPTGTS QPQRPEDCRP RGSVKGTGLD FACDIYIWAP	
	210
LAGICVALLL SLIITLIC	
<b>人 (SEQ ID NO:57)</b>	140
150	
TTT PPRPPTPAP	
	160 170 180
190 200	
TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYC	
<b>细胞质区 I (PI3K 募集) (SEQ ID NO:42)</b>	
500 510 520	
530	
L YAAPQLHSIQ SGPSHEEDAD SYENMDKSDD LEPA	
<b>细胞质区 II (FcERG) (下划线部分: SEQ ID NO:41; 全长序列: SEQ</b>	

**ID NO:45)**

```

                10                20
30                40                50
MISAVILFLL LLVEQAAA LG EPQLCYILDA VLFLYGIVLT LLYCRLKIQV
                60                70
80
RKAATASREK ADAVYTGLNT RSQETYETLK HEKPPQ
    
```

**小鼠 CH2 (pFuse) (SEQ ID NO:33)**

```

PNLLGGPSVF IFPPKIKDVL MISLSPIVTC VVVDVSEDDP DVQISWVFN
VEVHTAQTQT HREDYNSTLR VVSALPIQHQ DWMSGKEFKC KVNNDLPAP
IERTISKPK
    
```

**前导子(SEQ ID NO:38; 粗体), P5 (SEQ ID NO:39; 斜体), 细胞质结构域 I (SEQ ID NO:30, 下划线), 细胞质区 1 (SEQ ID NO:42, 粗体和斜体); 全长序列: SEQ ID NO:56**

```

MALPVTALLL PLALLLHAAR P**SQFR VSP
TV GGGYSKAQKAQAKQAKQAKQAKQAKQAKQAKQ VTPTV
                410                420
430                440                450
AYEEPDSEEG SEFYENDSNL GQDQVSQDGS GYENPEDEPM GPEEDSFSN
                460                470
480                490                500
AESYENADEE LAQPVGRMMD FLSPHGSARD PSREASSLGS QSYEDMRGI****L
                510                520
530                540                547
YAAPQLHSIQ SGPSHEEDAD SYENMDKSDD LEPA***WEGEGH MGTWGTT
    
```

[0320]

**设计参数(CAR-P)**

信号肽: aa 1–21 CD8 (Uniprot Q96QR6\_人)  
 细胞外抗体序列:  
 V-L 链: aa 23–130 抗 CD19 CAR (Genbank AMZ04819) –  
 GS 接头: ggtggcggtggctcgggcggtgggtgggtcgggtggcgcggtatct (SEQ ID NO:46 –  
 V-H 链: aa 148–267 抗 CD19 CAR (Genbank AMZ04819)  
 茎/跨膜: aa 138–206 CD8 (Uniprot Q96QR6\_人)  
 细胞质序列: aa 500–534 小鼠 CD19 (Uniprot CD19\_小鼠)融合到 aa 19–86 小鼠 Fc ERG 前体(FCERG\_小鼠)  
 荧光团: mGFP

**最终 CAR-P 构建体-345aa (全长序列: SEQ ID NO:43)**



- [0346] 细胞质结构域I (SEQ ID NO:30)
- [0347] AESYENADEE LAQPVGRMMD FLSPHGSAWD PSRE
- [0348] 细胞质结构域II (SEQ ID NO:31)
- [0349] GEPQLCYILDA VFLYGIIVLTL LYCRLKIQVRK AAIASREKADA VYTGLNTRSQE  
TYETLKHEKPP Q
- [0350] p5+14-间隔子 (SEQ ID NO:32)
- [0351] ISAMQVTPTV GGGYSKAQKA QAKQAKQAQK AQKAQAKQAK QAQKAQKAQA KQAKQVTPTV
- [0352] CH2 (SEQ ID NO:33)
- [0353] PNLLGGPSVF IFPPKIKDVL MISLSPIVTC VVVDVSEDDP DVQISWVFN VEVHTAQTQT  
HREDYNSTLR VVSALPIQHQ DWMSGKEFKC KVNKDL P IERTISKPK
- [0354] 11-1F4 VL序列变体 (SEQ ID NO:34)
- [0355] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYL QKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRF  
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDL GLYFCFQTTYVPNTFGGGTKLEIK
- [0356] 11-1F4 VH序列变体 (SEQ ID NO:35)
- [0357] QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGK GLEWLGVIWGDGSTNYHPNLSRL  
SISKDISKSQVLFKLSLQTD DTATYYCVTLDYWGQGTSTVTVSS
- [0358] 间隔子 (SEQ ID NO:36)
- [0359] VTPTV
- [0360] p5+14-间隔子+CH2 (SEQ ID NO:37)
- [0361] ISAMQVTPTV GGGYSKAQKA QAKQAKQAQK AQKAQAKQAK QAQKAQKAQA KQAKQVTPTV  
PNLLGGPSVF IFPPKIKDVL MISLSPIVTC VVVDVSEDDP DVQISWVFN VEVHTAQTQT HREDYNSTLR  
VVSALPIQHQ DWMSGKEFKC KVNKDL P IERTISKPK
- [0362] 来自“最终CAR-P构建体”的分泌前导子 (SEQ ID NO:38)
- [0363] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSP
- [0364] 来自“最终CAR-P构建体”的淀粉样蛋白结合肽和间隔子 (P5) (SEQ ID NO:39)
- [0365] TVGGYSKAQKAQAKQAQKAQKAQAKQAQKVTPTV
- [0366] 来自“最终CAR-P构建体”的间隔子和跨膜结构域 (SEQ ID NO:40)
- [0367] TTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACD IYIWAPLAGICVALLLSLIITLIC
- [0368] 来自“最终CAR-P构建体”的细胞质区II (SEQ ID NO:41)
- [0369] LGEPQLCYILDAVFLYGIIVLTL LYCRLKIQVRKAAIASREKA DAVYTGLNTRSQET YETLKHEKPPQ
- [0370] 来自“最终CAR-P构建体”的细胞质区I (SEQ ID NO:42)
- [0371] LYAAPQLHSIQSGPSHEEDADSYENMDKSDLEPA
- [0372] 最终CAR-P构建体-345aa (SEQ ID NO:43)
- [0373] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSP TVGGYSKAQKAQ AKQAKQAQKAQKAQAKQVTPTVP  
NLLGGPSVFI FPPKIKDV LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN VEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSAL  
PIQH QDWMSGKEFKCKVNKDL P IERTISKPK TTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFA  
CDIYIW APLAGICVALLLSLIITLIC LGEPQLCYILDAVFLYGIIVLTL LYCRLK IQVRKAAIASREKADAVYT  
GLNTRSQET YETLKHEKPPQLYAAPQ LHSIQSGPSHEEDADSYENMDKSDLEPA
- [0374] 来自“最终CAR-P构建体”的分泌前导子+p5+14-间隔子+CH2 (SEQ ID NO:44) MA

LPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPTVGGGYSKAQKAQAKQ AKQAQKAQKAQAKQAKQVTPNLLGGPSVFI  
FPPKIKDVLMS LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNST LRVVSALPIQHGDWMSG  
KEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK

[0375] 细胞质区II (FcERG), 全长, 参见表3 (SEQ ID NO:45)

[0376] MISAVILFLL LLVEQAAA LG EPQLCYILDA VFLYGIIVLT LLYCRLKIQV RKAASREK  
ADAVYTGLNT RSQETYETLK HEKPPQ

[0377] 来自设计参数的GS接头, 参见表3 (SEQ ID NO:46)

[0378] GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGC GGATCT

[0379] scFv序列, 11-1F4 VL、scFv接头和11-1F4 VH的组合, 如表 1中所示 (SEQ ID NO:  
47)

[0380] DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISYRASKSVS TSGYSYMHWN QKPGQPPRL LIYLVSNLES  
GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHIRELTR FGGGTKLEIK R GGSSRSSSSGG GSGGGG  
QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSL SYGVSWVRQP PGKLEWLGW IWGDGSTNYH PNLMRSLSI  
SKDISKSQVL FKLNSLQTD TATYYCVTLD YWQGTSVTV S

[0381] 具有N端前导子的scFv序列, 前导子、11-1F4 VL、scFv接头和11-1F4 VH的组合, 如  
表1中所示 (SEQ ID NO:48)

[0382] MASPLTRFLS LNLLLLGESI ILGSGEA DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISYRASKSVS  
TSGYSYMHWN QKPGQPPRL LIYLVSNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHIRELTR  
FGGGTKLEIK R GGSSRSSSSGG GSGGGG QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSL SYGVSWVRQP  
PGKLEWLGW IWGDGSTNYH PNLMRSLSI SKDISKSQVL FKLNSLQTD TATYYCVTLD YWQGTSVTV  
S

[0383] 全长11-1F4 CAR串联, 来自表1的序列、仅细胞质结构域II 的组合 (SEQ ID NO:  
49)

[0384] MASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGEADIVLTQSPASLAVSLGQR ATISYRASKSVSTSGYSYMHWN  
QKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPA RFGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRFGGGTKLEIK RGG  
SRSSSSGGGGSGGGGQVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGF SLSSYGVSWVRQPPGKLEWLGVIWGDGSTNYH  
PNLMRSLSISK DISKSQVLFKLNSLQTD TATYYCVTLDYWGQTSVTVSKVNSTT TKPVL RTPSPVHPTGTS  
QPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWA PLAGICVALLSLIITLICGEPQLCYILDAVFLYGIIVLTLLYCR  
KIQ VRKAASREKADAVYTGLNTRSQETYETLKHEKPPQ

[0385] 全长11-1F4CAR串联, 来自表1的序列、细胞质结构域I和II 的组合 (SEQ ID NO:  
50)

[0386] MASPLTRFLSLNLLLLGESIILGSGEADIVLTQSPASLAVSLGQR ATISYRASKSVSTSGYSYMHWN  
QKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPA RFGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRFGGGTKLEIK RGG  
SRSSSSGGGGSGGGGQVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGF SLSSYGVSWVRQPPGKLEWLGVIWGDGSTNYH  
PNLMRSLSISK DISKSQVLFKLNSLQTD TATYYCVTLDYWGQTSVTVSKVNSTT TKPVL RTPSPVHPTGTS  
QPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWA PLAGICVALLSLIITLICGEPQLCYILDAVFLYGIIVLTLLYCR  
KIQ VRKAASREKADAVYTGLNTRSQETYETLKHEKPPQAESYENAD EELAQPVGRMMDFLSPHGSWDPSRE

[0387] 最终CAR-P构建体, 仅细胞质结构域II, 基于表3 (SEQ ID NO:51)

[0388] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPTVGGGYSKAQKAQ AKQAQKAQKAQKAQAKQAKQVTPNLLGGPSVFI

NLLGGPSVFI FPPKIKDV LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSAL  
PIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKT TTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFA  
CDIYIW APLAGICVALLLSLIITLICGEPQLCYILDAVFLYGIVLTLLYCRLK IQVRKAAIASREKADAVYT  
GLNTRSQETYETLKHEKPPQ

[0389] 最终CAR-P构建体-345aa不具有分泌前导序列,基于表3 (SEQ ID NO:52) TVGGGY  
SKAQKAQKAQKAQKAQKAQKAQKAQKQVTPTVPNLL GGPSVFI FPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ  
ISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNN KDL PAPIERTISKPKTTTTKPVLR  
TPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGS VKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICGEPQLCYILDAV LF  
LYGIVLTLLYCRLKIQRVRAAIASREKADAVYTGLNTRSQETYE TLKHEKPPQLYAAPQLHSIQSGPSHEEDADS  
YENMDKSDDLEPA

[0390] 最终CAR-P构建体,仅细胞质结构域II,不具有分泌前导序列 (SEQ ID NO:53) T  
VGGGYSKAQKAQKAQKAQKAQKAQKAQKQVTPTVPNLL GGPSVFI FPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDD  
DPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNN KDL PAPIERTISKPKTTTT  
KPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGS VKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICGEPQLCYILDA  
V LFLYGIVLTLLYCRLKIQRVRAAIASREKADAVYTGLNTRSQETYE TLKHEKPPQ

[0391] 全长11-1F4 CAR串联,来自表1的序列、仅细胞质结构域II 的组合,不具有分泌前  
导子 (SEQ ID NO:54)

[0392] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQ KPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFS  
GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAAT YYCQHIRELTRFGGGTKLEIKRGGSSRSSSSGGGGGGVQLK ESGPGLV  
APSQSL SITCTVSGFSLSSYGVS WVRQPPGKGLEWLGVI WGDGSTNYHPNLMSRSL SISKDISKSQVLFKLNLSLQ  
TDDTATYYC VTLDYWGQTSVTVSKVNSTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYI  
WAPLAGICVALLLSLIITLICGEPQLCY ILDAVFLYGIVLTLLYCRLKIQRVRAAIASREKADAVYTGLNTRS  
QETYETLKHEKPPQ

[0393] 全长11-1F4 CAR串联,来自表1的序列的组合,不具有分泌前导子 (SEQ ID NO:55)

[0394] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQ KPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFS  
GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAAT YYCQHIRELTRFGGGTKLEIKRGGSSRSSSSGGGGGGVQLK ESGPGLV  
APSQSL SITCTVSGFSLSSYGVS WVRQPPGKGLEWLGVI WGDGSTNYHPNLMSRSL SISKDISKSQVLFKLNLSLQ  
TDDTATYYC VTLDYWGQTSVTVSKVNSTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYI  
WAPLAGICVALLLSLIITLICGEPQLCY ILDAVFLYGIVLTLLYCRLKIQRVRAAIASREKADAVYTGLNTRS  
QETYETLKHEKPPQAESYENADEELAQPVGRMMDFLSPHGS AWDP SRE

[0395] 前导子、P5、细胞质结构域I、细胞质区域;全长序列,参见表3 (SEQ ID NO:56)

[0396] MALPVTALLLPLALLLHAARP\*\*SQFRVSPTVGGGYSKAQKA QAKQAKQAQKAQKAQKAQKQVTPT  
VAYEEDPSEEGSEFYENDS NLGQDQVSQDGSYENPEDEPMGPEEEDSFSNAESYENADEELA QPVGRMMDFLS  
PHGSAWDPSREASSLGSQSYEDMRGI\*\*\*\*LYAAP QLHSIQSGPSHEEDADSYENMDKSDD LEPA\*\*\*\*WEGEGH  
MGTWGTT

[0397] 间隔子/跨膜结构域,人,参见表3 (SEQ ID NO:57)

[0398] T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G A V H T R G L D F A C  
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0399] 间隔子 (SEQ ID NO:58)

- [0400] KVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQQRPEDCRPRGSVKGTGL DF ACD  
[0401] 跨膜结构域 (SEQ ID NO:59)  
[0402] IYIWAPLAGICVALLSLI ITLIC

## 序列表

<110> 田纳西大学研究基金会 (UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION)

<120> 用于去除淀粉样蛋白的嵌合抗原受体

<130> 16599-20005.40

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> US 62/962,763

<151> 2020-01-17

<160> 59

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala

1                    5                    10                    15

Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln

20                    25

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Arg Ala Gln Arg Ala Gln Ala Arg Gln Ala Arg Gln Ala Gln Arg Ala

1                    5                    10                    15

Gln Arg Ala Gln Ala Arg Gln Ala Arg Gln

20                    25

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

Gly Ala Gln Gly Ala Gln Ala Gly Gln Ala Gly Gln Ala Gln Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Gly Ala Gln Ala Gly Gln Ala Gly Gln  
                   20                    25

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys  
 1                    5                    10                    15

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

Lys Ala Gln Ala Lys Ala Gln Ala Lys Ala Gln Ala Lys Ala Gln Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Lys Ala Gln Ala Lys Ala Gln Ala Lys Ala Gln Ala Lys  
                   20                    25

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

Lys Ala Gln Gln Ala Gln Ala Lys Gln Ala Gln Gln Ala Gln Lys Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Gln Ala Gln Ala Lys Gln Ala Gln Gln  
                   20                    25

<210> 7

<211> 26

<212> PRT



<223> D型对映异构体

<400> 10

Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln  
                   20                   25

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> D型对映异构体

<400> 11

Val Tyr Lys Val Lys Thr Lys Val Lys Thr Lys Val Lys Thr Lys Val  
 1                   5                   10                   15  
 Lys Thr

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (3)

<223> D型对映异构体

<400> 12

Ala Gln Ala Tyr Ser Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln  
                   20                   25                   30

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (3)

<223> D型对映异构体

<400> 13

Ala	Gln	Ala	Tyr	Ala	Arg	Ala	Gln	Arg	Ala	Gln	Ala	Arg	Gln	Ala	Arg
1				5					10					15	
Gln	Ala	Gln	Arg	Ala	Gln	Arg	Ala	Gln	Ala	Arg	Gln	Ala	Arg	Gln	
			20					25						30	

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (4) .. (31)

<223> D型对映异构体

<400> 14

Ala	Gln	Ala	Tyr	Ser	Lys	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln	Ala	Lys	Gln	Ala	Lys
1				5					10					15	
Gln	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln	Ala	Lys	Gln	Ala	Lys	Gln	
			20					25						30	

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

Ala	Gln	Ala	Tyr	Ser	Lys	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln	Ala	Lys	Gln	Ala	Lys
1				5					10					15	
Gln	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln	Ala	Lys	Gln	Ala	Lys	Gln	
			20					25						30	

<210> 16

<211> 31

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 4

<223> D型对映异构体

<400> 16

Ala Gln Ala Tyr Ser Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys

1                    5                    10                    15

Gln Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln

                  20                    25                    30

<210> 17

<211> 40

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 17

Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala

1                    5                    10                    15

Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala Gln Lys

                  20                    25                    30

Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln

                  35                    40

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 18

Arg Ala Gln Arg Ala Gln Ala Arg Gln Ala Arg Gln Ala Gln Arg Ala

1                    5                    10                    15

Gln Arg Ala Gln Ala Arg Gln Ala Arg Gln Ala Gln Arg Ala Gln Arg

                  20                    25                    30

Ala Gln Ala Arg Gln Ala Arg Gln

                  35                    40

<210> 19  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213>人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <400> 19  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
                   20                   25                   30  
 Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
                   35                   40                   45  
 Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
                   50                   55                   60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg  
                   85                   90                   95  
 Glu Leu Thr Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
                   100                   105                   110

<210> 20  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213>人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <400> 20  
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
                   35                   40                   45  
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Asn Leu Met  
                   50                   55                   60  
 Ser Arg Ser Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Leu  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

		85				90				95					
Val	Thr	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	
			100					105					110		
<210> 21															
<211> 10															
<212> PRT															
<213>人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 合成构建体															
<400> 21															
Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr	Gly	Val	Ser						
1				5					10						
<210> 22															
<211> 16															
<212> PRT															
<213>人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 合成构建体															
<400> 22															
Val	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	His	Pro	Asn	Leu	Met	Ser
1				5					10				15		
<210> 23															
<211> 3															
<212> PRT															
<213>人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 合成构建体															
<400> 23															
Leu	Asp	Tyr													
1															
<210> 24															
<211> 16															
<212> PRT															
<213>人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 合成构建体															
<400> 24															
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Arg	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 25

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1                    5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 26

Phe Gln Thr Thr Tyr Val Pro Asn Thr

1                    5

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 27

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1                    5                    10                    15

Gly Gly

<210> 28

<211> 27

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 28

Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Leu

1                    5                    10                    15

Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala

                  20                    25

<210> 29

<211> 71

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 29

Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg  
                   20                   25                   30  
 Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile  
                   35                   40                   45  
 Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser  
           50                   55                   60  
 Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys  
 65                   70

<210> 30

<211> 34

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 30

Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Ala Asp Glu Glu Leu Ala Gln Pro Val Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Met Met Asp Phe Leu Ser Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser  
                   20                   25                   30  
 Arg Glu

<210> 31

<211> 67

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 31

Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Val Leu Phe Leu Tyr  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg  
                   20                   25                   30  
 Lys Ala Ala Ile Ala Ser Arg Glu Lys Ala Asp Ala Val Tyr Thr Gly  
                   35                   40                   45  
 Leu Asn Thr Arg Ser Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys  
           50                   55                   60  
 Pro Pro Gln  
 65  
 <210> 32

<211> 60

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 32

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

1                    5                    10                    15

Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala Gln

20                    25                    30

Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala

35                    40                    45

Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Val Thr Pro Thr Val

50                    55                    60

<210> 33

<211> 109

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 33

Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile

1                    5                    10                    15

Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val

20                    25                    30

Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val

35                    40                    45

Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp

50                    55                    60

Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln

65                    70                    75                    80

Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp

85                    90                    95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys

100                    105

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 34

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

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

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

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 36

Val Thr Pro Thr Val

1 5

<210> 37

<211> 169

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 37

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

1 5 10 15

Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala Gln

20 25 30

Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala

35 40 45

Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Val Thr Pro Thr Val Pro Asn Leu Leu

50 55 60

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu

65 70 75 80

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

85 90 95

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu

100 105 110

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr

115 120 125

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser

130 135 140

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro

145 150 155 160

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys

165

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 38

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  
                   20                   25

<210> 39

<211> 38

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 39

Thr Val Gly Gly Gly Tyr Ser Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Lys Gln Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys  
                   20                   25                   30  
 Gln Val Thr Pro Thr Val  
                   35

<210> 40

<211> 67

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 40

Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser  
                   20                   25                   30  
 Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala  
                   35                   40                   45  
 Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr  
                   50                   55                   60  
 Leu Ile Cys

65

<210> 41

<211> 68

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 41

Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Val Leu Phe Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile Gln Val  
                   20                   25                   30  
 Arg Lys Ala Ala Ile Ala Ser Arg Glu Lys Ala Asp Ala Val Tyr Thr  
                   35                   40                   45  
 Gly Leu Asn Thr Arg Ser Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu  
           50                   55                   60  
 Lys Pro Pro Gln

65

<210> 42

<211> 35

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 42

Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu His Ser Ile Gln Ser Gly Pro Ser His  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Glu Asp Ala Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Lys Ser Asp Asp Leu  
                   20                   25                   30  
 Glu Pro Ala  
                   35

<210> 43

<211> 345

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 43

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 Thr Val Gly Gly  
                   20                   25                   30

Gly Tyr Ser Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala  
 35 40 45  
 Gln Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Val Thr Pro  
 50 55 60  
 Thr Val Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys  
 85 90 95  
 Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp  
 100 105 110  
 Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg  
 115 120 125  
 Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln  
 130 135 140  
 His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn  
 145 150 155 160  
 Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Thr  
 165 170 175  
 Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly  
 180 185 190  
 Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val  
 195 200 205  
 Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro  
 210 215 220  
 Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Ile Cys Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Val Leu  
 245 250 255  
 Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile  
 260 265 270  
 Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Ala Ser Arg Glu Lys Ala Asp Ala Val  
 275 280 285  
 Tyr Thr Gly Leu Asn Thr Arg Ser Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys  
 290 295 300  
 His Glu Lys Pro Pro Gln Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu His Ser Ile  
 305 310 315 320  
 Gln Ser Gly Pro Ser His Glu Glu Asp Ala Asp Ser Tyr Glu Asn Met  
 325 330 335  
 Asp Lys Ser Asp Asp Leu Glu Pro Ala

	340	345
<210>	44	
<211>	175	
<212>	PRT	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	44	
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 Thr Val Gly Gly		
	20	25 30
Gly Tyr Ser Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala		
	35	40 45
Gln Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Val Thr Pro		
	50	55 60
Thr Val Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro		
65	70	75 80
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys		
	85	90 95
Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp		
	100	105 110
Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg		
	115	120 125
Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln		
	130	135 140
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn		
145	150	155 160
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys		
	165	170 175
<210>	45	
<211>	86	
<212>	PRT	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	45	
Met Ile Ser Ala Val Ile Leu Phe Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala		
1	5	10 15

Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Val Leu  
 20 25 30  
 Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile  
 35 40 45  
 Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Ala Ser Arg Glu Lys Ala Asp Ala Val  
 50 55 60  
 Tyr Thr Gly Leu Asn Thr Arg Ser Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys  
 65 70 75 80  
 His Glu Lys Pro Pro Gln  
 85

<210> 46

<211> 45

<212> DNA

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 46

ggtggcggtg gctcgggchg tggtgggtcg ggtggcggcg gatct 45

<210> 47

<211> 240

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 47

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

Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser  
 130 135 140  
 Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 165 170 175  
 Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Asn Leu  
 180 185 190  
 Met Ser Arg Ser Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val  
 195 200 205  
 Leu Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Cys Val Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
 225 230 235 240  
 <210> 48  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213>人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <400> 48  
 Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala Asp Ile Val Leu Thr  
 20 25 30  
 Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile  
 35 40 45  
 Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met  
 50 55 60  
 His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 85 90 95  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu  
 100 105 110  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Phe  
 115 120 125

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser  
 130 135 140  
 Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile  
 165 170 175  
 Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Val Ser Trp  
 180 185 190  
 Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp  
 195 200 205  
 Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Asn Leu Met Ser Arg Ser Leu  
 210 215 220  
 Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Leu Phe Lys Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Thr Leu Asp  
 245 250 255  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
 260 265

<210> 49

<211> 405

<212> PRT

<213>人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 49

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Phe  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser  
 130 135 140  
 Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile  
 165 170 175  
 Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Val Ser Trp  
 180 185 190  
 Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp  
 195 200 205  
 Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Asn Leu Met Ser Arg Ser Leu  
 210 215 220  
 Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Leu Phe Lys Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Thr Leu Asp  
 245 250 255  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Lys Val Asn Ser Thr  
 260 265 270  
 Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly  
 275 280 285  
 Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val  
 290 295 300  
 Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu  
 325 330 335  
 Ile Cys Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Val Leu Phe  
 340 345 350  
 Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile Gln  
 355 360 365  
 Val Arg Lys Ala Ala Ile Ala Ser Arg Glu Lys Ala Asp Ala Val Tyr  
 370 375 380  
 Thr Gly Leu Asn Thr Arg Ser Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His  
 385 390 395 400  
 Glu Lys Pro Pro Gln  
 405

<210> 50





65		70		75		80									
Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys
				85					90					95	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp
				100					105					110	
Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg
				115					120					125	
Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln
				130					135					140	
His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn
145					150					155				160	
Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr
				165						170				175	
Thr	Thr	Lys	Pro	Val	Leu	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	His	Pro	Thr	Gly
				180						185				190	
Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Arg	Pro	Glu	Asp	Cys	Arg	Pro	Arg	Gly	Ser	Val
				195						200				205	
Lys	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro
				210						215				220	
Leu	Ala	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Ile	Thr	Leu
225					230					235				240	
Ile	Cys	Leu	Gly	Glu	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Ile	Leu	Asp	Ala	Val	Leu
				245						250				255	
Phe	Leu	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Leu	Tyr	Cys	Arg	Leu	Lys	Ile
				260						265				270	
Gln	Val	Arg	Lys	Ala	Ala	Ile	Ala	Ser	Arg	Glu	Lys	Ala	Asp	Ala	Val
				275						280				285	
Tyr	Thr	Gly	Leu	Asn	Thr	Arg	Ser	Gln	Glu	Thr	Tyr	Glu	Thr	Leu	Lys
				290						295				300	
His	Glu	Lys	Pro	Pro	Gln										
305					310										
<210>	52														
<211>	317														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	合成构建体														
<400>	52														
Thr	Val	Gly	Gly	Gly	Tyr	Ser	Lys	Ala	Gln	Lys	Ala	Gln	Ala	Lys	Gln

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



Ala Asp Ala Val Tyr Thr Gly Leu Asn Thr Arg Ser Gln Glu Thr Tyr  
260 265 270

Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln  
275 280

<210> 54  
<211> 378  
<212> PRT  
<213>人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成构建体  
<400> 54

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



Glu Leu Thr Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly  
 100 105 110  
 Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser  
 130 135 140  
 Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 165 170 175  
 Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Asn Leu  
 180 185 190  
 Met Ser Arg Ser Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val  
 195 200 205  
 Leu Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Cys Val Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
 225 230 235 240  
 Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro  
 245 250 255  
 Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg  
 260 265 270  
 Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile  
 275 280 285  
 Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser  
 290 295 300  
 Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu  
 305 310 315 320  
 Asp Ala Val Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys  
 325 330 335  
 Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Ala Ser Arg Glu Lys  
 340 345 350  
 Ala Asp Ala Val Tyr Thr Gly Leu Asn Thr Arg Ser Gln Glu Thr Tyr  
 355 360 365  
 Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln Ala Glu Ser Tyr Glu Asn  
 370 375 380  
 Ala Asp Glu Glu Leu Ala Gln Pro Val Gly Arg Met Met Asp Phe Leu  
 385 390 395 400  
 Ser Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu

	405	410
<210>	56	
<211>	213	
<212>	PRT	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	56	
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Thr Val Gly Gly		
	20	25
Gly Tyr Ser Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Ala		
	35	40
Gln Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Lys Gln Ala Lys Gln Val Thr Pro		
	50	55
Thr Val Ala Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu Gly Ser Glu Phe Tyr		
65	70	75
Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Val Ser Gln Asp Gly Ser		
	85	90
Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Met Gly Pro Glu Glu Glu Asp		
	100	105
Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Ala Asp Glu Glu Leu Ala		
	115	120
Gln Pro Val Gly Arg Met Met Asp Phe Leu Ser Pro His Gly Ser Ala		
	130	135
Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ser Leu Gly Ser Gln Ser Tyr Glu		
145	150	155
Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu His Ser Ile Gln		
	165	170
Ser Gly Pro Ser His Glu Glu Asp Ala Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp		
	180	185
Lys Ser Asp Asp Leu Glu Pro Ala Trp Glu Gly Glu Gly His Met Gly		
	195	200
Thr Trp Gly Thr Thr		
	210	
<210>	57	
<211>	69	
<212>	PRT	

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 57

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
1                   5                   10                   15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
                  20                   25                   30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile  
                  35                   40                   45

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val  
                  50                   55                   60

Ile Thr Leu Tyr Cys

65

<210> 58

<211> 47

<212> PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 58

Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro  
1                   5                   10                   15

Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg  
                  20                   25                   30

Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
                  35                   40                   45

<210> 59

<211> 24

<212> PRT

<213>人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 59

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu  
1                   5                   10                   15

Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys

20

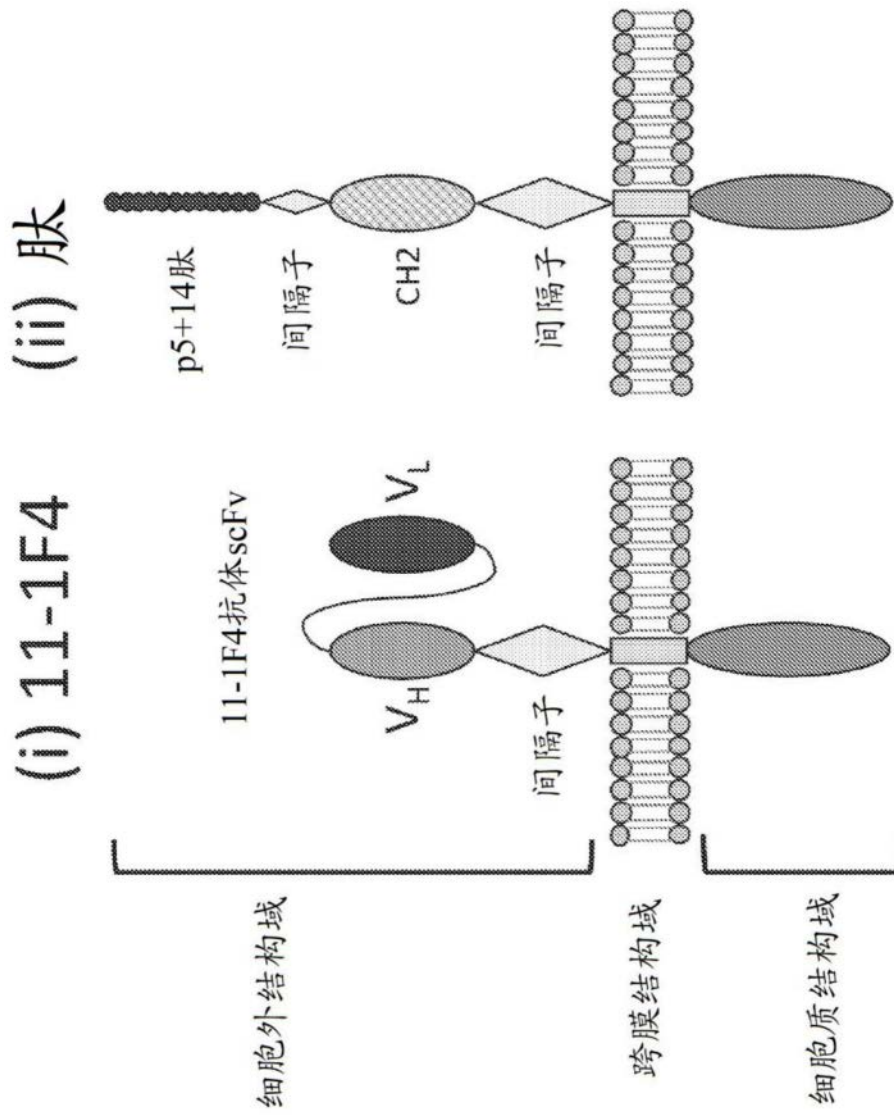


图1

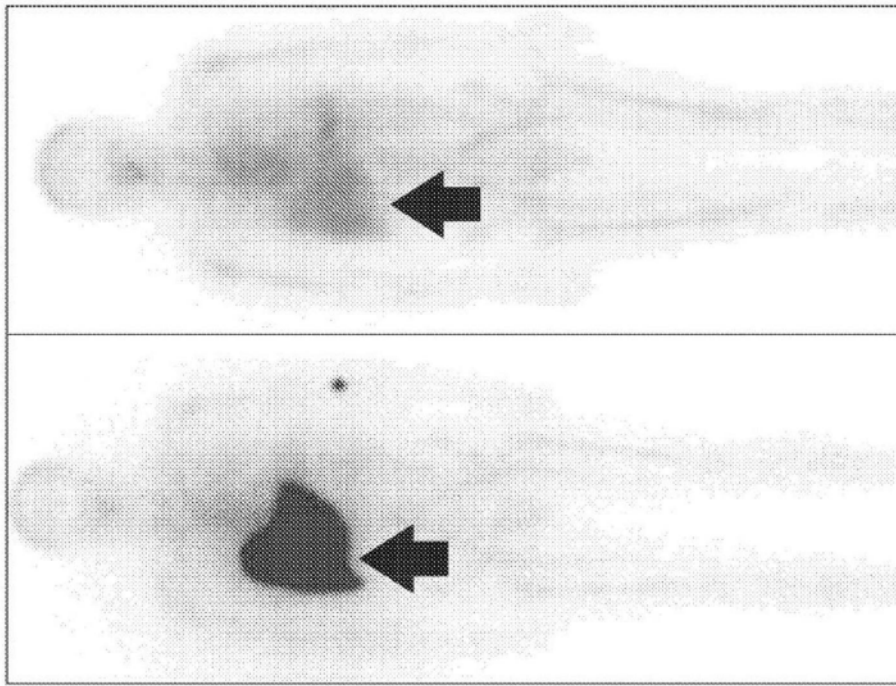


图2

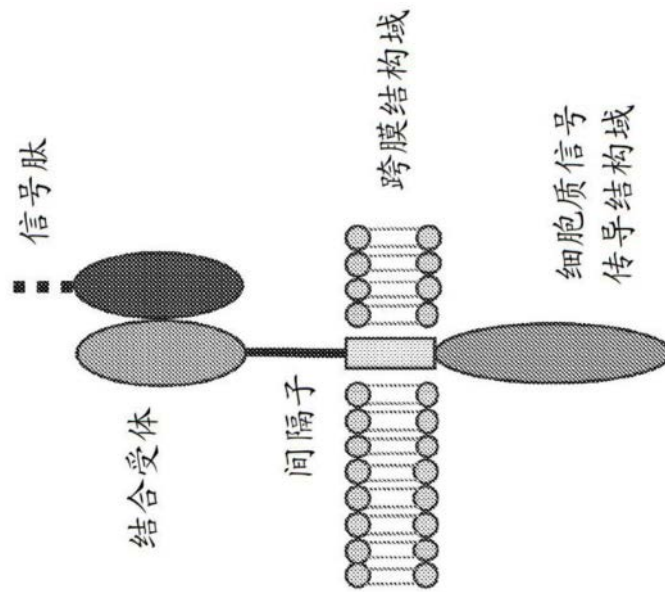


图3



图4A

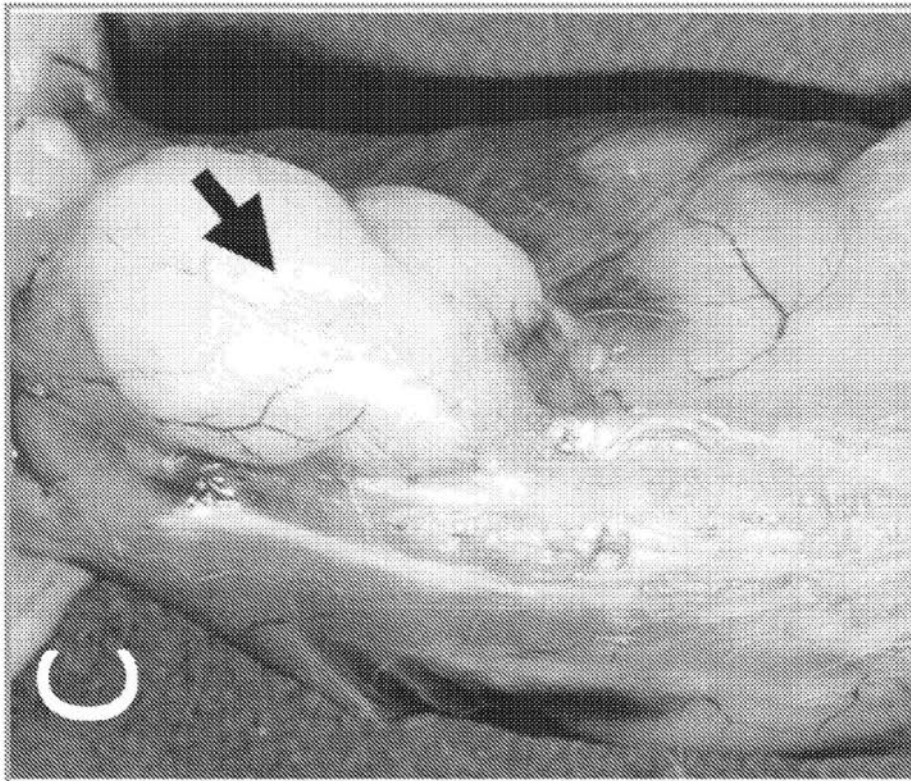


图 4C

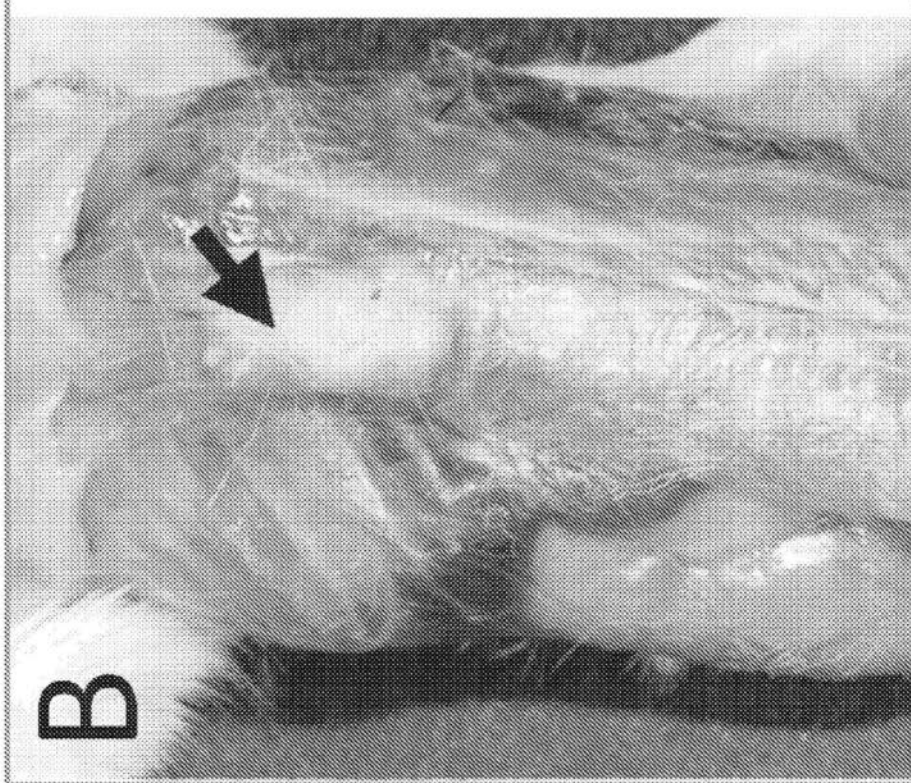


图 4B

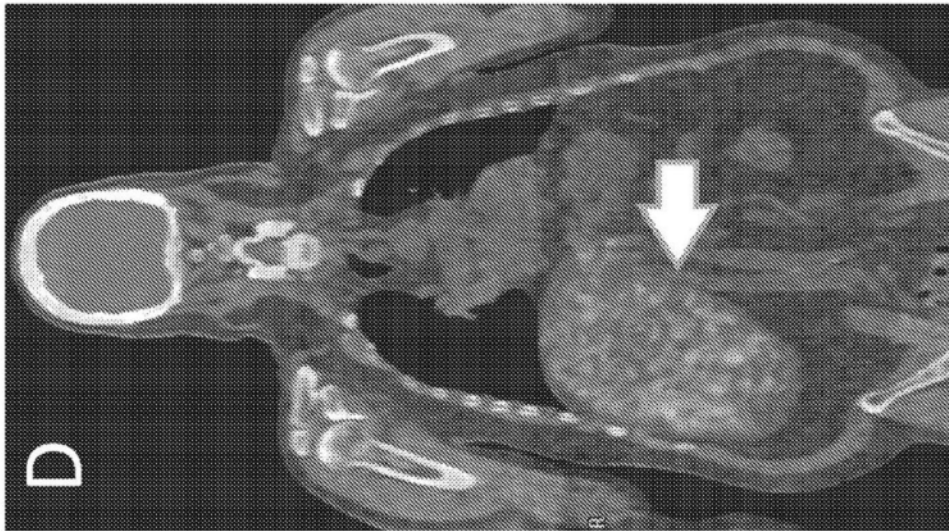


图4D

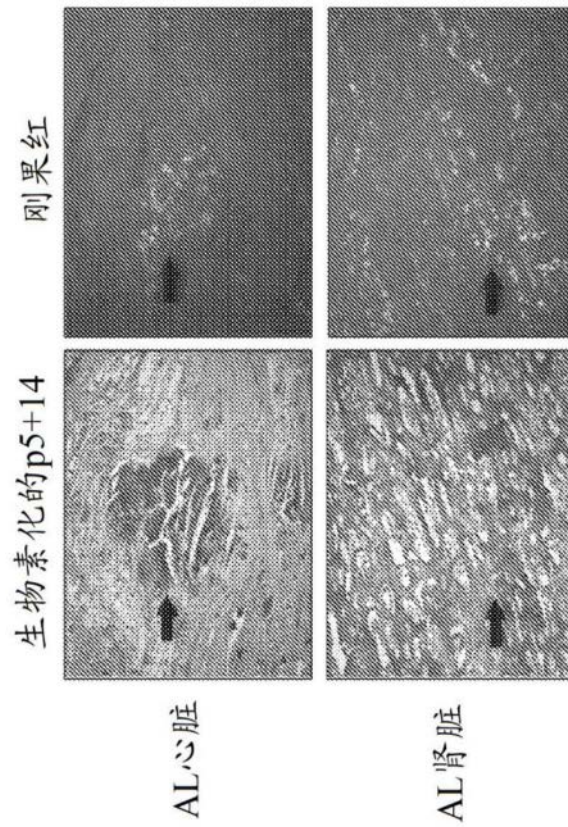


图5A

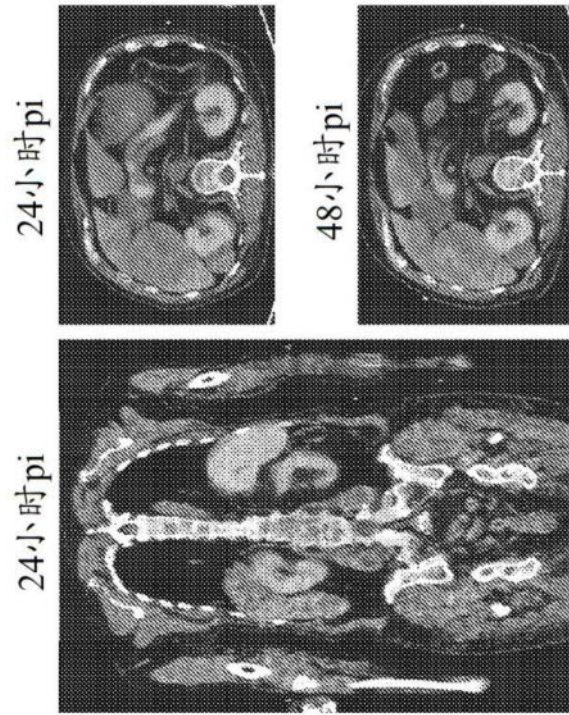


图5B

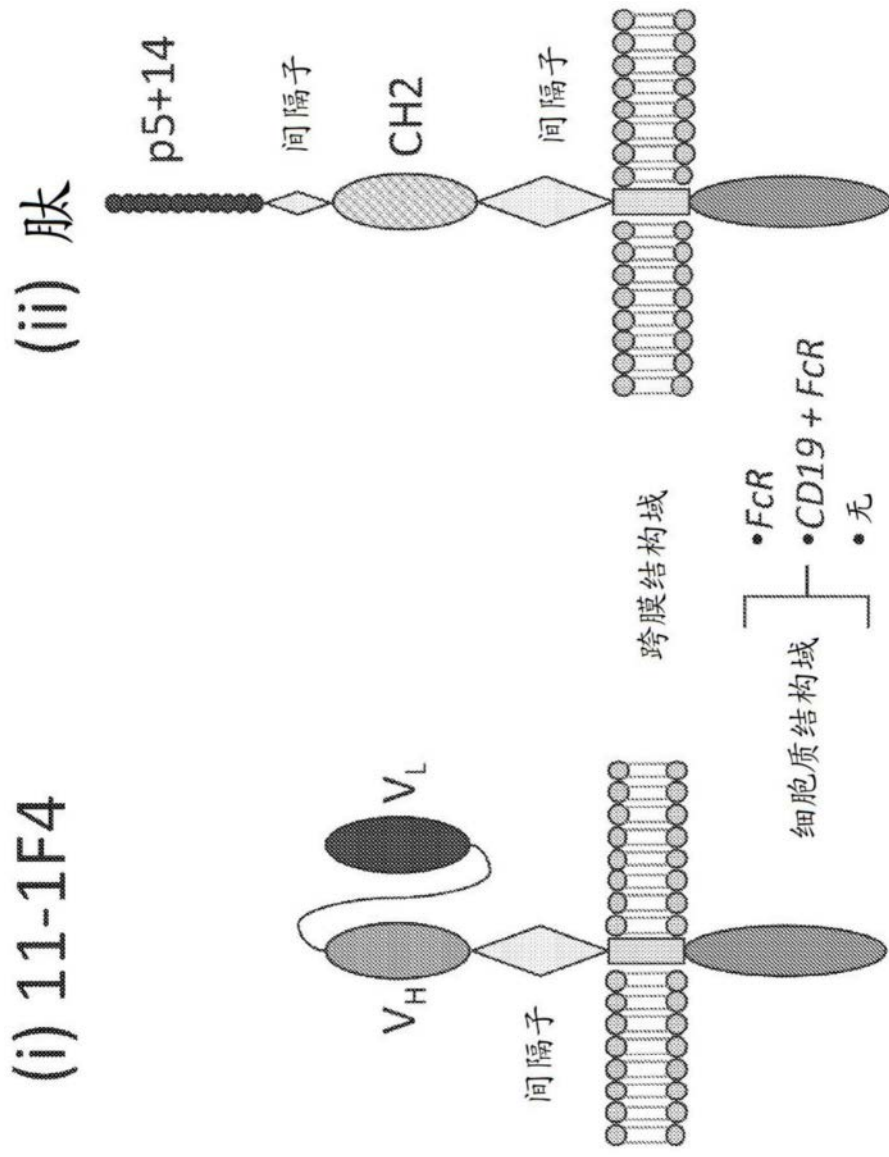


图6