



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110423282 A

(43)申请公布日 2019.11.08

(21)申请号 201910722248.1

C12N 15/62(2006.01)

(22)申请日 2014.02.14

C12N 5/10(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 39/00(2006.01)

61/765,585 2013.02.15 US

A61P 35/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201480016737.0 2014.02.14

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 吴佳蓉 J·奥努夫尔

W·A·利姆

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理

有限公司 11329

代理人 孙涛 肖鹏

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书47页

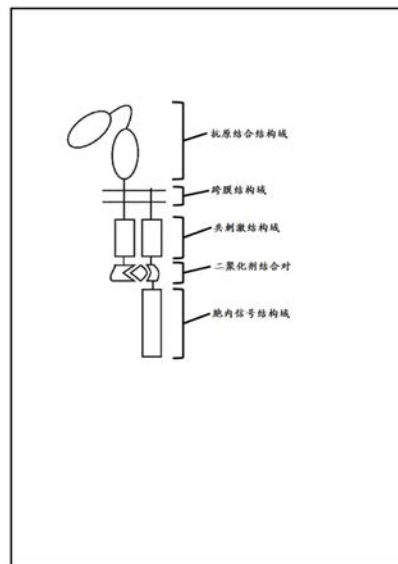
序列表82页 附图57页

(54)发明名称

嵌合抗原受体及其使用方法

(57)摘要

本公开涉及嵌合抗原受体及其使用方法。本公开提供了异二聚体条件激活嵌合抗原受体(CAR),和包含编码所述CAR的核苷酸序列的核酸。本公开提供了经遗传修饰以产生所述CAR的细胞。本公开的CAR可用于多种方法,还公开了所述方法。



1. 一种异二聚体条件激活嵌合抗原受体 (CAR), 其包含:
 - a) 第一多肽, 其含有:
 - i) 特异性结合对的第一成员;
 - ii) 第一调节结构域;
 - iii) 二聚化对的第一成员; 和
 - iv) 插入在所述特异性结合对的第一成员和所述第一调节结构域之间的跨膜结构域;
 - 和
 - b) 第二多肽, 其含有:
 - i) 跨膜结构域;
 - ii) 第二调节结构域;
 - iii) 所述二聚化对的第二成员; 和
 - iv) 胞内信号结构域;
- 或者包含:
 - a) 第一多肽, 其含有:
 - i) 特异性结合对的第一成员;
 - ii) 调节结构域;
 - iii) 二聚化对的第一成员; 和
 - iv) 插入在所述特异性结合对的第一成员和所述调节结构域之间的跨膜结构域; 和
 - b) 第二多肽, 其含有:
 - i) 所述特异性结合对的第二成员; 和
 - ii) 胞内信号结构域。
2. 一种哺乳动物细胞, 其经遗传改造以产生权利要求1所述的异二聚体条件激活CAR。
3. 一种核酸, 其包含编码权利要求1所述的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列。
4. 一种重组表达载体, 其包含权利要求3所述的核酸。
5. 一种激活T淋巴细胞的方法, 所述方法包括使所述T淋巴细胞与二聚化剂和特异性结合对的第二成员接触, 其中所述T淋巴细胞经遗传修饰以产生权利要求1的异二聚体条件激活CAR, 并且其中在所述二聚化剂和所述特异性结合对的第二成员的存在下, 所述异二聚体条件激活CAR二聚化并且激活所述T淋巴细胞, 从而产生激活的T淋巴细胞。
6. 一种产生权利要求2所述的细胞的方法, 所述方法包括用包含编码权利要求1所述的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列的表达载体对哺乳动物细胞进行遗传修饰, 或者用包含编码权利要求1所述的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列的RNA对哺乳动物细胞进行遗传修饰。
7. 一种治疗个体中的癌症的方法, 所述方法包括:
 - i) 用包含编码权利要求1所述的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列的表达载体对获自所述个体的T淋巴细胞进行遗传修饰, 其中所述异二聚体条件激活CAR的抗原结合结构域对所述个体的癌细胞上的表位具有特异性, 并且其中所述遗传修饰离体进行;
 - ii) 将经遗传修饰的T淋巴细胞引入到所述个体中; 以及
 - iii) 向所述个体施用有效量的二聚化剂, 其中所述二聚化剂诱导所述异二聚体条件激活CAR的二聚化, 其中所述二聚化提供对所述经遗传修饰T淋巴细胞的激活以及对所述癌细

胞的杀伤,从而治疗所述癌症。

8. 一种调节宿主细胞的活性的方法,所述方法包括使所述宿主细胞与二聚化剂和特异性结合对的第二成员接触,其中所述T淋巴细胞经遗传修饰以产生权利要求1的异二聚体条件激活CAR,并且其中在所述二聚化剂和所述特异性结合对的第二成员的存在下,所述异二聚体条件激活CAR二聚化并且调节所述宿主细胞的至少一种活性。

嵌合抗原受体及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2014年2月14日、中国申请号为201480016737.0、发明名称为“嵌合抗原受体及其使用方法”的发明申请的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求于2013年2月15日提交的美国临时专利申请号61/765,585的权益,其通过引用整体并入本文。

[0004] 关于美国联邦政府资助研究的声明

[0005] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的基金号EY016546和GM101782的政府支持下完成的。美国政府对本发明享有一定权利。

[0006] 通过引用并入的作为文本文件提供的序列列表

[0007] 本文以于2014年2月13日建立的153KB大小的文本文件“UCSF-464W0 SeqList_ST25.txt”提供了序列列表。该文本文件的内容通过引用整体并入本文。

[0008] 引言

[0009] 在基于细胞的获得性免疫治疗中,可对分离自患者的免疫细胞进行修饰,以表达能够使细胞在随后被转移回患者后执行新的治疗性功能的合成蛋白。这样的合成蛋白的一个实例是嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)。当前使用的CAR的实例是胞外结构域(例如,抗原结合结构域)、跨膜结构域以及一个或多个胞内信号结构域的融合。在抗原结合后,CAR的胞内信号部分可使免疫细胞开始激活相关应答,例如释放溶细胞性分子以诱导肿瘤细胞死亡,等等。但是,这样的CAR无法进行药理学上的控制。本领域中需要可以药理学上控制的条件激活CAR。

[0010] 概述

[0011] 本公开提供了异二聚体条件激活嵌合抗原受体(CAR),以及包含编码CAR的核苷酸序列的核酸。本公开提供了经遗传修饰以产生CAR的细胞。本公开的CAR可用于多种方法,该方法同样由本文提供。

[0012] 本公开提供了下述实施方案。

[0013] 1.一种异二聚体条件激活嵌合抗原受体(CAR),其包含:

[0014] a) 第一多肽,其含有:

[0015] i) 特异性结合对的第一成员;

[0016] ii) 第一调节结构域;

[0017] iii) 二聚化对的第一成员;和

[0018] iv) 插入在所述特异性结合对的第一成员和所述第一调节结构域之间的跨膜结构域;和

[0019] b) 第二多肽,其含有:

[0020] i) 跨膜结构域;

[0021] ii) 第二调节结构域;

[0022] iii) 所述二聚化对的第二成员;和

[0023] iv) 胞内信号结构域;

- [0024] 或者包含：
- [0025] a) 第一多肽,其含有：
- [0026] i) 特异性结合对的第一成员；
- [0027] ii) 调节结构域；
- [0028] iii) 二聚化对的第一成员；和
- [0029] iv) 插入在所述特异性结合对的第一成员和所述调节结构域之间的跨膜结构域；
- 和
- [0030] b) 第二多肽,其含有：
- [0031] i) 所述特异性结合对的第二成员；和
- [0032] ii) 胞内信号结构域。
- [0033] 2. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述第一多肽包含插入在所述特异性结合对的第一成员和所述跨膜结构域之间的铰链区。
- [0034] 3. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述特异性结合对的第一成员是抗体或抗体片段、配体或受体。
- [0035] 4. 根据实施方案2所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述铰链区是免疫球蛋白IgG铰链区或来自CD8的铰链。
- [0036] 5. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述第一调节结构域和所述第二调节结构域选自4-1BB (CD137)、CD28、ICOS、BTLA、OX-40、CD27、CD30、GITR、HVEM、DAP10、DAP12和CD28。
- [0037] 6. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述胞内信号结构域选自ZAP70和CD3- ζ 。
- [0038] 7. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述胞内信号结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM)。
- [0039] 8. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述二聚化对的第一成员和第二成员在小分子二聚化剂的存在下形成同二聚体。
- [0040] 9. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述二聚化对的第一成员和第二成员在小分子二聚化剂的存在下形成异二聚体。
- [0041] 10. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR,其中所述二聚化对的第一成员和第二成员选自：
- [0042] a) FK506结合蛋白 (FKBP) 和FKBP；
- [0043] b) FKBP和钙调磷酸酶催化亚基A (CnA)；
- [0044] c) FKBP和亲环素；
- [0045] d) FKBP和FKBP-雷帕霉素相关蛋白 (FRB)；
- [0046] e) 旋转酶B (GyrB) 和GyrB；
- [0047] f) 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 和DHFR；
- [0048] g) DmrB和DmrB；
- [0049] h) PYL和ABI；
- [0050] i) Cry2和CIP；
- [0051] j) GAI和GID1。

- [0052] 11. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR, 其中:
- [0053] i) 所述第一调节结构域和所述第二调节结构域衍生自4-1BB;
- [0054] ii) 所述二聚化对的第一成员和第二成员是FKBP和FRB; 以及
- [0055] iii) 所述信号结构域包含ITAM。
- [0056] 12. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR, 其中所述特异性结合对的第一成员是单链Fv。
- [0057] 13. 根据实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR, 其中所述特异性结合对的第一成员结合存在于细胞上、固体表面上或脂质双层上的表位。
- [0058] 14. 根据实施方案13的所述异二聚体条件激活CAR, 其中所述细胞是癌细胞。
- [0059] 15. 一种哺乳动物细胞, 其经遗传改造以产生实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR。
- [0060] 16. 根据实施方案15所述的细胞, 其中所述细胞是干细胞、祖细胞或衍生自干细胞或祖细胞的细胞。
- [0061] 17. 根据实施方案15所述的细胞, 其中所述细胞是T淋巴细胞或NK细胞。
- [0062] 18. 一种核酸, 其包含编码实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列。
- [0063] 19. 根据实施方案18所述的核酸, 其中所述核苷酸序列与T淋巴细胞特异性启动子或NK细胞特异性启动子可操作地连接。
- [0064] 20. 根据实施方案18所述的核酸, 其中所述核酸是体外转录的RNA。
- [0065] 21. 一种重组表达载体, 其包含实施方案18所述的核酸。
- [0066] 22. 一种激活T淋巴细胞的方法, 所述方法包括使所述T淋巴细胞与二聚化剂和特异性结合对的第二成员接触, 其中所述T淋巴细胞经遗传修饰以产生实施方案1的异二聚体条件激活CAR, 并且其中在所述二聚化剂和所述特异性结合对的第二成员的存在下, 所述异二聚体条件激活CAR二聚化并且激活所述T淋巴细胞, 从而产生激活的T淋巴细胞。
- [0067] 23. 根据实施方案22所述的方法, 其中所述特异性结合对的第二成员是抗原。
- [0068] 24. 根据实施方案22所述的方法, 其中所述接触在体内进行。
- [0069] 25. 根据实施方案22所述的方法, 其中所述激活的T淋巴细胞介导对靶细胞的杀伤。
- [0070] 26. 根据实施方案22所述的方法, 其中所述激活的T淋巴细胞产生IL-2和/或IFN- γ 。
- [0071] 27. 根据实施方案25所述的方法, 其中所述靶细胞是癌细胞。
- [0072] 28. 根据实施方案22所述的方法, 其中所述异二聚体条件激活CAR的特异性结合对的第一成员是癌细胞上的表位特异性的抗体。
- [0073] 29. 一种产生实施方案15所述的细胞的方法, 所述方法包括用包含编码实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列的表达载体对哺乳动物细胞进行遗传修饰, 或者用包含编码实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列的RNA对哺乳动物细胞进行遗传修饰。
- [0074] 30. 根据实施方案29所述的方法, 其中所述遗传修饰离体进行。
- [0075] 31. 根据实施方案29所述的方法, 其中所述细胞是T淋巴细胞、干细胞、NK细胞、祖细胞、衍生自干细胞的细胞或衍生自祖细胞的细胞。

- [0076] 32. 一种治疗个体中的癌症的方法,所述方法包括:
- [0077] i) 用包含编码实施方案1所述的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列的表达载体对获自所述个体的T淋巴细胞进行遗传修饰,其中所述异二聚体条件激活CAR的抗原结合结构域对所述个体的癌细胞上的表位具有特异性,并且其中所述遗传修饰离体进行;
- [0078] ii) 将经遗传修饰的T淋巴细胞引入到所述个体中;以及
- [0079] iii) 向所述个体施用有效量的二聚化剂,其中所述二聚化剂诱导所述异二聚体条件激活CAR的二聚化,其中所述二聚化提供对所述经遗传修饰T淋巴细胞的激活以及对所述癌细胞的杀伤,从而治疗所述癌症。
- [0080] 33. 根据实施方案32所述的方法,其中所述二聚化剂是雷帕霉素类。
- [0081] 34. 一种调节宿主细胞的活性的方法,所述方法包括使所述宿主细胞与二聚化剂和特异性结合对的第二成员接触,其中所述T淋巴细胞经遗传修饰以产生实施方案1的异二聚体条件激活CAR,并且其中在所述二聚化剂和所述特异性结合对的第二成员的存在下,所述异二聚体条件激活CAR二聚化并且调节所述宿主细胞的至少一种活性。
- [0082] 35. 根据实施方案34所述的方法,其中所述活性是增殖、细胞存活、凋亡、基因表达或免疫激活。
- [0083] 36. 根据实施方案34所述的方法,其中所述特异性结合对的第二成员是抗原。
- [0084] 附图简述
- [0085] 图1A和图1B提供了构建体#122的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0086] 图2A和图2B提供了构建体#123的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0087] 图3A和图3B提供了构建体#125的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0088] 图4提供了构建体#126的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0089] 图5A和图5B提供了构建体#168的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0090] 图6A至图6C提供了构建体#169的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0091] 图7A和图7B构建体#170的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0092] 图8A和图8B构建体#197的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0093] 图9A至图9C提供了构建体#206的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0094] 图10A和图10B构建体#207的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0095] 图11A至图11C提供了构建体#199的结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0096] 图12描绘了由5个开关CAR变体引起的IL-2产生。
- [0097] 图13描绘了对照Jurkat细胞系的IL-2产生。
- [0098] 图14描绘了CAR构建体“122+206”和“197+206”之间的比较。
- [0099] 图15描绘了利用开关CAR“197+206”的细胞毒性数据。
- [0100] 图16描绘了使用CAR构建体“122+199”、“197+199”和“122+168”的T细胞激活数据。
- [0101] 图17是示例性开关CAR的示意图。
- [0102] 图18A和图18B描绘了多个示例性开关CAR。
- [0103] 图19A至图19G示出了由识别人间皮素的3种不同开关CAR变体引起的IL-2产生。
- [0104] 图20A至图20C示出了由具有赤霉素响应性二聚化对的开关CAR变体引起的IL-2产生。
- [0105] 图21A至图21D示出了具有多个共刺激结构域的示例性开关CAR和常规CAR。

- [0106] 图22A和图22B提供了构建体#270的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0107] 图23A和图23B提供了构建体#300的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0108] 图24A和图24B提供了构建体#336的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0109] 图25A和图25B提供了构建体#337的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0110] 图26A和图26B提供了构建体#357的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0111] 图27A和图27B提供了构建体#365的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0112] 图28A和图28B提供了构建体#366的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0113] 图29A和图29B提供了构建体#367的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0114] 图30A和图30B提供了构建体#398的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0115] 图31A和图31B提供了构建体#399的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0116] 图32A和图32B提供了构建体#400的核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0117] 图33A和图33B提供了构建体#358的核苷酸序列和氨基酸序列。

[0118] 定义

[0119] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用,是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核苷酸)的聚合物形式。因此,该属于包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂合体或者包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然、化学或生化修饰、非天然或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0120] 属于“抗体”和“免疫球蛋白”包括任意同种型的抗体或免疫球蛋白,保留了对于抗原的特异性结合的抗体片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv和Fd片段,嵌合抗体,人源化抗体,单链抗体,以及包含抗体的抗原结合片段和非抗体蛋白的融合蛋白。

[0121] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,例如完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv;双抗体;线性抗体(Zapata等,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生了两个被称为“Fab”片段的相同抗原结合片段,其各自具有单个抗原结合位点,和“Fc”片段,其名称反映稳定结晶的能力。胃蛋白酶处理产生了F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合片段并且依然能够交联抗原。

[0122] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的V_H结构域和V_L结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。在一些实施方案中,Fv多肽还在V_H结构域和V_L结构域之间包含多肽接头,其能够使sFv形成用于抗原结合的期望结构。对于sFv的综述,参见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113章,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0123] 本文使用的术语“亲和力”是指两种试剂之间可逆结合的平衡常数,表示为解离常数(K_d)。亲和力可以比抗体对于不相关氨基酸序列亲和力高至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、或至少1000-倍或更多。抗体对于靶蛋白的亲和力可以为例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM、约100nM至约1皮摩尔(pM)、或约100nM至约1飞摩尔(femtomolar, fM)或更多。本文使用的术语“亲合力(avidity)”是指两种或更多种试剂的复合物在稀释后的耐解离性。在本文关于抗体和/或抗原结合片段的术语“免疫反应性”和“优选结合”在可互换使用。

[0124] 术语“结合”是指由于例如共价相互作用、静电相互作用、疏水相互作用以及离子键和/或氢键相互作用(包括相互作用如盐桥和水桥)的两个分子之间的直接缔合。非特异性结合可以是指具有小于约 10^{-7} M的亲合力结合,例如具有 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M等亲和力的结合。

[0125] 本文使用的术语“铰链区”是指提供结构柔性以及与侧翼多肽区域的间隔的由天然或合成多肽组成得柔性多肽连接件区域(在本文中也称为“铰链”或“间隔区”)。来源于免疫球蛋白(例如IgG1)的“铰链区”通常以由人IgG1的G1u₂₁₆延伸到Pro₂₃₀定义(Burton(1985) Molec. Immunol., 22:161-206)。其他IgG同种型的铰链区可通过将形成重链间二硫(S-S)键的第一个和最后一个半胱氨酸残基放在相同位置来与IgG1序列比对。铰链区可以是天然存在的或非天然存在的,包括但不限于如美国专利号5,677,425中所述改变的铰链区。铰链区可包括来源于不同类别或来自CH1结构域类别的亚类抗体的完整铰链区。术语“铰链区”还可包括来源于CD8和其他在提供柔性和与侧翼区域的间隔区中提供类似功能的受体的区域。

[0126] “分离的”多肽是已经被鉴定并且从其天然环境中的组分中分离和/或回收的多肽。其天然环境的污染物组分是可能干扰多肽的诊断或治疗用途的物质,可能包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中,通过在还原或非还原条件下使用考马斯亮蓝或银染色的十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将多肽纯化(1)至通过劳里法(Lowry method)确定的抗体的按重量计大于90%、大于95%或大于98%,例如按重量计大于99%,(2)至足以通过使用转杯式测序仪获得N末端或中间氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至均匀。分离的多肽包括重组细胞中的原位多肽,因为多肽天然环境的至少一种组分不存在。再一些情况下,通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽。

[0127] 本文使用的术语“免疫细胞”通常包括衍生自骨髓中产生的造血干细胞(HSC)的白细胞(白血球)。“免疫细胞”包括例如淋巴细胞(T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞)和来自骨髓的细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞)。

[0128] “T细胞”包括所有类型的表达CD3的免疫细胞,包括辅助T细胞(CD4⁺细胞)、细胞毒性T细胞(CD8⁺细胞)、调节性T细胞(Treg)和 γ - δ T细胞。

[0129] “细胞毒性细胞”包括CD8⁺T细胞、自然杀伤(NK)细胞和中性粒细胞,该细胞能够介导细胞毒性反应。

[0130] 本文使用的术语“干细胞”通常包括多能(pluripotent)和全能(multipotent)干细胞。“干细胞”包括例如胚胎干细胞(ES)、间充质干细胞(MSC)、诱导的多能干细胞(iPS)和定向祖细胞(造血干细胞(HSC)、骨髓衍生细胞等)。

[0131] 本文使用的术语“治疗”(treatment, treating)等是指获得期望的药理学和/或生理学结果。结果可以是预防性的,在完全或部分地预防疾病或其症状方面,和/或可以是治疗性的,在部分地或完全地治愈疾病和/或疾病在形成的不利影响方面。本文使用的“治疗”涵盖哺乳动物例如人中的疾病的任何治疗,包括(a)在可能易感于疾病但是尚未诊断出具有疾病的患者中预防疾病发生;(b)抑制疾病,即遏制其发展;以及(c)减轻疾病,即导致疾病消退。

[0132] 术语“个体”、“对象”、“宿主”和“患者”在本文可互换使用,是指哺乳动物,包括但不限于鼠科动物(例如,大鼠、小鼠)、图形目动物(例如,兔)、非人灵长类动物、人、犬、猫、有

蹄类动物(例如,马、牛、绵羊、猪、山羊)等。

[0133] “治疗有效量”或“有效量”是指药剂的量或两种药剂的组的量,其在向哺乳动物骨或其他对象施用用于治疗疾病时,足以实现对这种疾病的治疗。“治疗有效量”可根据药剂、疾病及其严重程度,以及待治疗对象的年龄、体重等变化。

[0134] 在详细描述本发明和之前,需要理解的是,本发明不限于本文描述的特定实施方案,因为其当然可以变化。还应理解的是,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不是旨在限制,因为本发明的范围仅由所附权利要求书限定。

[0135] 当提供值的范围时,应理解的是,介于该范围的上限和下限之间的每一个中间值(除非上下文明确地另有说明,否则中间值是下限单位的十分之一)和任何其他所说明的或者在所说明范围内的中间值都包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在较小范围内,并且也包括在本发明内,服从于在范围内的任意具体包括的限值。当所指出的范围包括一个或两个界限时,排除了那些所包括的界限之一或两者的范围也包括在本发明内。

[0136] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员的通常理解相同的含义。虽然可以使用与本文描述的那些类似的或等同的任何方法和材料来实施本发明,但是下面描述的是优选的方法和材料。本文提到的所有出版物均通过引用并入本文,以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。

[0137] 应注意的是,本文和所附权利要求中使用的未用数量词限定的名词包括复数指示对象,除非上下文明确地另外说明。因此,例如,提到“嵌合抗原受体”包括多个这样的嵌合抗原受体,提到“二聚化剂(dimerizer)结合对”包括提到一个或多个二聚化剂结合对及其本领域技术人员已知的等同物,等等。还应注意的是,权利要求可能撰写为排除了任何可选元素。因此,这种陈述旨在用于使用与作为与权力要求要素的引用相关的排他性术语如“单独地”“仅”等或使用“负”限定的先行基础。

[0138] 应理解,为了清楚而提供描述在分开的实施方案的上限文中的本发明的某些特征也可组合地提供在单个实施方案中。发过来,为了简洁而描述在单个实施方案的上下文中的本发明的多个特征也可分开或以任何合适的亚组合提供。本发明相关的实施方案的所有组合均明确地包括在本发明中并且由本文所公开,就如同每一个组合均被单独地并且明确得公开。此外,多个实施方案及其要素的亚组合也明确地包括在本发明中并且由本文所公开,就如同每一个亚组合均被单独地并且明确得公开。

[0139] 本文讨论的出版物仅被提供用于其在本申请的申请日之前的公开内容。本文没有内容可以被解释为承认本发明不能凭借在先发明而有权先于这些出版物。此外,所提供的出版物日期可能不同于实际出版日期,后者可能需要独立地确认。

[0140] 详述

[0141] 本公开提供了异二聚体条件激活嵌合抗原受体(CAR,以及包含编码CAR的核苷酸序列的核酸。本公开提供了被遗传修饰以产生CAR的细胞。本公开的CAR可用于多种方法,该方法同样被提供。

[0142] 异二聚体条件激活嵌合抗原受体

[0143] 本公开提供了异二聚体条件激活嵌合抗原受体,为了简化起见,本文将其“CAR”。

[0144] 在一些实施方案中,本公开的CAR包含:a)第一多肽,其含有:i)特异性结合对的成

员(例如,抗原结合结构域);ii)第一调节结构域;iii)二聚化对的第一成员;和iv)插入在特异性结合对的成员(例如,抗原结合结构域)和第一调节结构域之间的跨膜结构域;和b)第二多肽,其含有:i)跨膜结构域;ii)第二调节结构域;iii)二聚化对的第二成员;和iv)胞内信号结构域。调节结构域可以是共刺激结构域。

[0145] 在一些实施方案中,本公开的CAR包含:a)第一多肽,其含有:i)特异性结合对的成员(例如,抗原结合结构域);ii)第一共刺激结构域;iii)二聚化对(例如,二聚化剂结合对)的第一成员;和iv)插入在特异性结合对的成员(例如,抗原结合结构域)和第一共刺激结构域之间的跨膜结构域;和b)第二多肽,其含有:i)跨膜结构域;ii)第二共刺激结构域;iii)二聚化对(例如,二聚化剂结合对)的第二成员;和iv)胞内信号结构域。

[0146] 在一些实施方案中,本公开的CAR包含:a)第一多肽,其含有:i)特异性结合对的成员(例如,抗原结合结构域);ii)调节结构域;iii)二聚化对(例如,二聚化剂结合对)的第一成员;和iv)插入在特异性结合对的成员(例如,抗原结合结构域)和调节结构域之间的跨膜结构域;和b)第二多肽,其含有:i)二聚化对(例如,二聚化剂结合对)的第二成员;和ii)胞内信号结构域。

[0147] 在一些实施方案中,本公开的CAR包含:a)第一多肽,其含有:i)特异性结合对的成员(例如,抗原结合结构域);ii)共刺激结构域;iii)二聚化对(例如,二聚化剂结合对)的第一成员;和iv)插入在特异性结合对的成员(例如,抗原结合结构域)和共刺激结构域之间的跨膜结构域;和b)第二多肽,其含有:i)二聚化对(例如,二聚化剂结合对)的第二成员;和ii)胞内信号结构域。

[0148] 图17中示例性给出了本发明CAR的一个实例。本公开的CAR可以存在于真核细胞如哺乳动物细胞的浆膜中,其中合适的哺乳动物细胞包括但不限于:细胞毒性细胞、T篱笆细胞、干细胞、干细胞的后代、祖细胞、祖细胞的后代和NK细胞。当存在于真核细胞的浆膜中时,本公开的CAR在以下物质的存在下激活:1)结合CAR中的二聚化剂结合对的第一和第二成员或者以其他方式诱导二聚体的第一成员和第二成员的二聚化的二聚化剂;以及2)结合特异性结合对的成员(例如,抗原结合结构域)的因子,例如结合CAR的抗原结合结构域的抗原。结合特异性结合对的成员的因子是特异性结合对的第二成员。特异性结合对的第二成员可以是可溶(例如,不与细胞结合)因子;存在于细胞(如靶细胞)表面上的因子;存在于固体表面上的因子;存在于脂质双层中的因子等。当特异性结合对的成员是抗体时,特异性结合对的第二成员可以是抗原,抗原可以是可溶(例如,不与细胞结合)抗原;存在于细胞(如靶细胞)表面上的抗原;存在于固体表面上的抗原;存在于脂质双层中的抗原等。

[0149] 在一些情况下,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被结合CAR的特异性结合对的成员的特异性结合对的第二成员(例如,结合CAR的抗原结合结构域的抗原)和二聚化剂激活时,细胞中至少一种核酸的表达增加。例如,在一些情况下,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被结合CAR的抗原结合结构域的抗原和二聚化剂激活时,与不存在抗原和/或二聚化剂的情况下核酸的转录水平相比,细胞中至少一种核酸的表达增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。

[0150] 例如,本公开的CAR的第二多肽可包含含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞内信号多肽,在这种情况下,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被

结合CAR的抗原结合结构域的抗原和二聚化剂激活时,活化T细胞的核因子(NFAT)依赖性转录增加。NFAT依赖性转录包括由NFAT家族的任意成员诱导的转录,成员包括例如NFATc1、NFATc2、NFATc3、NFATc4、NFAT5;AP-1;Sp1;NK κ B等。

[0151] 当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被结合CAR的抗原结合结构域的抗原和二聚化剂激活时,在一些情况下,可导致细胞的一种或多种细胞因子的产生增加。例如,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被结合CAR的抗原结合结构域的抗原和二聚化剂激活时,与不存在抗原和/或二聚化剂的情况下细胞产生的细胞因子的量相比,可使细胞的细胞因子的产生增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。产生可能增加的细胞因子包括但不限于干扰素,例如IL-2、干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-15、IL-12、IL-4、IL-5、IL-10;趋化因子;生长因子等。

[0152] 在一些情况下,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被结合CAR的抗原结合结构域的抗原和二聚化剂激活时,可导致细胞中核酸的转录增加以及细胞的细胞因子的产生增加二者。

[0153] 在一些情况下,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被二聚化剂激活时,导致细胞对在其细胞表面表达有CAR的第一多肽的抗原结合结构域所结合的抗原的靶细胞的细胞毒活性。例如,在真核细胞是细胞毒性细胞(例如,NK细胞或细胞毒性T淋巴细胞)时,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被二聚化剂激活时,细胞对在其细胞表面表达有CAR的第一多肽的抗原结合结构域所结合的抗原的靶细胞的细胞毒活性增加。例如,在真核细胞是NK细胞或细胞毒性T淋巴细胞时,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被二聚化剂激活时,与不存在二聚化剂时细胞的细胞毒活性相比,细胞的细胞毒活性增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。

[0154] 在一些情况下,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被结合CAR的抗原结合结构域的抗原和二聚化剂激活时,可导致其他CAR相关事件,例如增殖和扩大(由于细胞分裂增加或抗凋亡反应)。

[0155] 在一些情况下,当本公开的CAR存在于真核细胞的浆膜中并且当被结合CAR的抗原结合结构域的抗原和二聚化剂激活时,可导致其他CAR相关事件,例如细胞内信号调变、细胞分化或细胞死亡。

[0156] 本公开的CAR可存在于真核细胞中,其中CAR的第一多肽和第二多肽彼此不共价连接。本公开的CAR可作为单个异二聚体存在于真核细胞膜中,其不与膜中的任何其他多肽共价连接。或者,本公开的第一CAR可作为与本公开的第二CAR共价或非共价连接的异二聚体存在于真核细胞膜中。在一些情况下,第一CAR和第二CAR通过存在于第一CAR的第一多肽和第二CAR的第一多肽二者中的铰链区中的半胱氨酸之间形成的二硫键共价连接。

[0157] 在一些情况下,本公开的CAR可存在于真核细胞膜中,其中CAR的第一多肽含有抗体片段,CAR的第二多肽含有来自细胞因子受体的信号转导结构域,使得在二聚化后,CAR可表现为异二聚体的信号体(signalobody)CAR,例如,由至少两个独立多肽构成的信号体。如

本领域中已知的，“信号体”是由抗体片段和来自细胞因子受体的信号转导结构域构成的单个嵌合高分子。在某些情况下，当本公开的异二聚体的信号体CAR存在于真核细胞的细胞膜中，被二聚化剂二聚化并且被抗原（例如，低聚抗原）激活时，可诱导异二聚体的信号体CAR进行低聚反应。这种配体诱导的异二聚体的信号体CAR的低聚反应可激活例如提高或保持信号转导，例如，配体诱导的异二聚体的信号体CAR的低聚反应可发送诱发细胞反应的信号。在一些情况下，可将多个异二聚体的信号体CAR用于组合以引起期望的细胞反应。

[0158] 特异性结合对的成员

[0159] 本公开的CAR包含特异性结合对的成员。特异性结合对包括但不限于抗原-抗体结合对、配体-受体结合对等。因此，适合用于本公开的CAR的特异性结合对的成员包括抗原、抗体、配体和配体结合受体。

[0160] 抗原结合结构域

[0161] 适合用于本公开的CAR的抗原结合结构域可以是任何抗原结合多肽，其中很多种是本领域中已知的。在一些情况下，抗原结合结构域是单链Fv (scFv)。另一些基于抗体的识别结构域 (cAb VHH (骆驼抗体可变结构域) 及人源化变体、IgNAR VH (鲨鱼抗体可变结构域) 及人源化变体、sdAb VH (单结构域抗体可变结构域) 及“骆驼源化”抗体可变结构域均适合使用。在一些情况下，基于T细胞受体 (TCR) 的识别结构域，例如单链TCR (scTv, 含有V α V β 的单链二结构域TCR) 也适合使用。

[0162] 适合用于本公开的CAR的抗原结合结构域可具有多种抗原结合特异性。在一些情况下，抗原结合结构域对存在于癌细胞表达 (合成) 的抗原 (基, 癌细胞相关抗原) 上的表位具有特异性。癌细胞相关抗原可以是以下癌细胞的相关抗原：例如，乳腺癌细胞、B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤、肺癌细胞 (例如，小细胞肺癌细胞)、非霍奇金B细胞淋巴瘤 (B-NHL) 细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤细胞、肺癌细胞 (例如，小细胞肺癌细胞)、黑素瘤细胞、慢性淋巴细胞白血病细胞、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、结直肠癌细胞等。癌细胞相关抗原还可以由非癌细胞表达。

[0163] 可与本发明CAR的抗原结合结构域结合的抗原的非限制性实例包括，例如CD19、CD20、CD38、CD30、Her2/neu、ERBB2、CA125、MUC-1、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、CD44表面粘附分子、间皮素、癌胚抗原 (CEA)、表皮生长因子受体 (EGFR)、EGFRvIII、血管内皮生长因子受体-2 (VEGFR2)、高分子量黑色素瘤相关抗原 (HMW-MAA)、MAGE-A1、IL-13R-a2、GD2等。

[0164] 配体

[0165] 在一些情况下，适合用于本发明CAR的特异性结合对的成员是受体的配体。配体包括但不限于：细胞因子 (例如，IL-13等)、生长因子 (例如，调蛋白 (heregulin)、血管内皮生长因子 (VEGF) 等)、整合素结合肽 (例如，包含序列Arg-Gly-Asp的肽) 等。

[0166] 当本发明CAR中的特异性结合对的成员是配体时，CAR可以在二聚化剂和特异性结合对的第二成员的存在下激活，其中还特异性结合对的第二成员是配体的受体。例如，当配体是VEGF时，特异性结合对的第二成员可以是VEGF受体，包括可溶性VEGF受体。又例如，当配体是调蛋白时，特异性结合对的第二成员可以是Her2。

[0167] 受体

[0168] 如上所述，在一些情况下，包含在本发明CAR中的特异性结合对的成员是受体，例如，配体的受体、共受体等。合适的受体包括但不限于：生长因子受体 (例如，VEGF受体)；杀

伤细胞凝集素样受体子族K,成员1 (NKG2D) 多肽 (MICA、MICB和ULB6的受体);细胞因子受体 (例如,IL-13受体、IL-2受体等);Her2;CD27;自然细胞毒性受体 (NCR) (例如,NKP30 (NCR3/CD337) 多肽 (HLA-B相关转录体3 (BAT3) 和B7-H6的受体) 等。

[0169] 铰链区

[0170] 在一些情况下,本发明CAR的第一多肽包含铰链区(在本文中也称为“间隔区”),其中铰链区插入在抗原结合结构域和跨膜结构域之间。在一些情况下,铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。在一些情况下,铰链区是来自受体的铰链区多肽(例如,来自CD8的铰链区)。

[0171] 铰链区的长度可以为如4个氨基酸至约50个氨基酸,例如约4aa至约10aa、约10aa至约15aa、约15aa至约20aa、约20aa至约25aa、约25aa至约30aa、约30aa至约40、或约40aa至约50aa。

[0172] 合适的间隔区可以容易地选择,并且可以是若干合适长度中的任意一种,例如1个氨基酸(例如,Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0173] 示例性间隔区包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括,例如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:37)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:38),其中n是至少为1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及其他本领域中已知的柔性接头。可以使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物,Gly和Ser二者是相对非结构化的,因此可作为组件之间的中性纽带。可以使用甘氨酸聚合物,甘氨酸甚至比丙氨酸显著占据更多phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基更不受限制(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。示例性间隔区可包含这样的氨基酸序列,其包括但不限于:GGSG(SEQ ID NO:39)、GGSGG(SEQ ID NO:40)、GSGSG(SEQ ID NO:41)、GSGGG(SEQ ID NO:42)、GGSG(SEQ ID NO:43)、GSSSG(SEQ ID NO:44)等。

[0174] 在一些情况下,本发明CAR的第一多肽的铰链区包含至少一个半胱氨酸。例如,在一些情况下,铰链区即可包含序列Cys-Pro-Pro-Cys。如果存在,第一CAR的铰链区中的半胱氨酸可用于与第二CAR中的铰链区形成二硫键。

[0175] 免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域中已知的,参见例如Tan等(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:162;和Huck等.(1986)Nucl.Acids Res.14:1779。作为非限制性实例,免疫球蛋白铰链区可以包含以下序列中的一种:DKTHT(SEQ ID NO:45);CPPC(SEQ ID NO:46);CPEPKSCDTPPPCPR(SEQ ID NO:47)(参见例如,Glaser等.(2005)J.Biol.Chem.280:41494);ELKTPLGDTTHT(SEQ ID NO:48);KSCDKTHTCP(SEQ ID NO:49);KCCVDCP(SEQ ID NO:50);KYGPPCP(SEQ ID NO:51);EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:52)(人IgG1铰链);ERKCCVECPPCP(SEQ ID NO:53)(人IgG2铰链);ELKTPLGDTTHTCPRCP(SEQ ID NO:54)(人IgG3铰链);SPNMVPHAHHAQ(SEQ ID NO:55)(人IgG4铰链)等。

[0176] 铰链区可包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区的氨基酸序列。与野生型(天然存在的)铰链区相比,铰链区可包括一个或更多个氨基酸替换和/或插入和/或缺失。例如,人IgG1铰链区的His₂₂₉可以替换成Tyr,因此铰链区包含序列EPKSCDKTYTCPPCP(SEQ ID NO:52);参见,例如Yan等.(2012)J.Biol.Chem.287:5891。

[0177] 铰链区可以包含来源于人CD8的氨基酸序列,例如,铰链区可以包含氨基酸序列T

TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:56) 或其变体。

[0178] 跨膜结构域

[0179] 本公开的CAR的第一多肽和第二多肽包含用于插入到真核细胞膜中的跨膜结构域。第一多肽的第一结构插入在抗原结合结构域和共刺激结构域之间。当第一多肽包含铰链区时,跨膜结构域插入在铰链区和共刺激结构域之间,这样,第一多肽以从氨基末端(N末端)到羧基末端(C末端)的顺序包含:抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域、第一从刺激结构域和二聚化剂结合对的第一成员。

[0180] 第二多肽的跨膜结构域出于多肽的N末端或在N末端附件,这样,第二多肽从N末端到C末端的顺序包含:跨膜结构域、第二共刺激结构域、二聚化剂结合对的第二成员和胞内信号结构域。

[0181] 任何被提供用于将多肽插入到真核(例如,哺乳动物)细胞的细胞膜内的跨膜(TM)结构域均适合使用。作为一个非限制性实例,可使用TM序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:30)。合适的TM序列的另外的非限制性实例包括:a)来自CD8 β :LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (SEQ ID NO:57);b)来自CD4的:ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVR (SEQ ID NO:58);c)来自CD3 ζ 的:LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (SEQ ID NO:59);d)来自CD28的:WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:60);e)来自CD134(OX40)的:VAAIILGLGLVLLGPLAILLALYLL (SEQ ID NO:61);和f)来自CD7的:ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (SEQ ID NO:62)。

[0182] 接头

[0183] 在一些情况下,本发明CAR的第一多肽包含任意两个相连接结构域之间的接头。例如,接头可以设置在第一多肽的跨膜结构域和第一共刺激结构域之间。又例如,结构可以设置在第一多肽的第一共刺激结构域和二聚化剂结合对的第一成员之间。又例如,接头可设置在第二多肽第二多肽的跨膜结构域恩和第二共刺激结构域之间。又例如,结构可设置在第二多肽的第二共刺激结构域和二聚化剂结合对的第二成员之间。又例如,接头可设置在第二多肽的二聚化剂结合对的第二成员和胞内信号结构域之间。

[0184] 接头肽可以是多种氨基酸序列中的任意一种。蛋白质可通过间隔区肽(通常为柔性)连接,但是也不排除其他化学连接。接头可以是长为约6至约40个氨基酸或长为约6只约25个氨基酸的肽。可使用合成的接头编码寡核苷酸产生这些接头以连接蛋白质。可使用具有柔韧度的肽接头。接头肽几乎可具有任意氨基酸序列,但应考虑到合适的结构将具有通常导致柔性肽的序列。小氨基酸如甘氨酸和丙氨酸被用于产生柔性肽。这样的序列的产生对于本领域技术人员来说是常规的。

[0185] 合适的接头可以容易地选择,并且可以是若干合适长度中的任意一种,例如1个氨基酸(例如,G1y)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0186] 示例性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括,例如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:37)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:38),其中n是至少为1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及其他本领域中已知的柔性接头。对于甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物二者很有兴趣,因为这两种氨基酸是相对非结构化的,因此可作为组件之

间的中性纽带。特别感兴趣的是甘氨酸聚合物,因为甘氨酸甚至比丙氨酸显著占据更多 phi-psi 空间,并且比具有较长侧链的残基更不受限制(参见 Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。示例性接头包括但不限于:GGSG (SEQ ID NO:39)、GGSGG (SEQ ID NO:40)、GSGSG (SEQ ID NO:41)、GSGGG (SEQ ID NO:42)、GGGSG (SEQ ID NO:43)、GSSSG (SEQ ID NO:44) 等。本领域技术人员将承认,与任意上述元件缀合的肽的设计可包含全部或部分柔性的接头,这样接头可包括柔性接头盒赋予较少柔性接头的的一个或多个部分。

[0187] 调节结构域

[0188] 适合本公开的CAR使用的调节结构域包括共刺激结构域。

[0189] 在一些情况下,本发明CAR的第一多肽上的调节结构域与CAR的第二多肽上的调节结构域具有基本相同的氨基酸序列。例如,在一些情况下,CAR的第一多肽上的调节结构域包含与CAR的第二多肽上的调节结构域的氨基酸序列至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%同一的氨基酸序列。本发明CAR的第一多肽的调节结构域可与本发明CAR的第二多肽的调节结构域具有基本相同的长度,例如,第一调节结构域和第二调节结构域彼此的长度可相差少于10个氨基酸或少于5个氨基酸。在一些情况下,第一调节结构域和第二调节结构域具有相同长度。

[0190] 适合包含在本发明CAR的第一多肽和第二多肽中的调节结构域可具有约30个氨基酸至约70个氨基酸(aa)的长度,例如,调节结构域可具有以下长度:约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa。在另一些情况下,调节结构域可具有约70aa至约100aa、约100aa至约200aa或大于200aa的长度。

[0191] 适合用于本公开的CAR的共刺激结构域通常是来自受体的多肽。在一些实施方案中,从刺激结构域同二聚体化(homodimerize)。合适的共刺激结构域可以是扩膜蛋白的胞内部分(即,从刺激结构域可来自跨膜蛋白)。合适的共刺激多肽的非限制性实例包括但不限于4-1BB (CD137)、CD28、ICOS、OX-40、BTLA、CD27、CD30、GITR和HVEM。

[0192] 在一些情况下,本发明CAR的第一多肽上的共刺激结构域与CAR的第二多肽上的共刺激结构域具有基本的氨基酸序列。例如,在一些情况下,CAR的第一多肽上的共刺激结构域包含与CAR的第二多肽上的共刺激结构域的氨基酸序列至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%同一的氨基酸序列。本发明CAR的第一多肽的共刺激结构域可与本发明CAR的第二多肽的共刺激结构域具有基本相同的长度,例如,第一共刺激结构域和第二共刺激结构域彼此的长度可相差少于10个氨基酸或少于5个氨基酸。在一些情况下,第一调节结构域和第二调节结构域具有相同长度。

[0193] 适合包含在本发明CAR的第一多肽和第二多肽中的共刺激结构域可具有约30个氨基酸至约70个氨基酸(aa)的长度,例如,共刺激结构域可具有以下长度:约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa。在另一些情况下,共刺激结构域可具有约70aa至约100aa、约100aa至约200aa或大于200aa的长度。

[0194] 在一些情况下,共刺激结构域来自扩膜蛋白4-1BB(也称为TNFRSF9、CD137、4-1BB、CDw137、ILA等)的胞内部分。例如,合适的共刺激结构域可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序

列同一性的氨基酸序列：

[0195] KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)。

在一些实施方案中，第一多肽和第二多肽二者的共刺激结构域具有约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa的长度。

[0196] 在一些情况下，共刺激结构域来自扩膜蛋白CD28 (也称为Tp44) 的胞内部分。例如，合适的共刺激结构域可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0197] FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:63)。

在一些实施方案中，第一多肽和第二多肽二者的共刺激结构域具有约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa的长度。

[0198] 在一些情况下，共刺激结构域来自扩膜蛋白ICOS (也称为AILIM、CD278和CVID1) 的胞内部分。例如，合适的共刺激结构域可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0199] TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO:64)。

在一些实施方案中，第一多肽和第二多肽二者的共刺激结构域具有约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa的长度。

[0200] 在一些情况下，共刺激结构域来自扩膜蛋白OX-40 (也称为TNFRSF4、RP5-902P8.3、ACT35、CD134、OX40、TXGP1L) 的胞内部分。例如，合适的共刺激结构域可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0201] RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:65)。

在一些实施方案中，第一多肽和第二多肽二者的共刺激结构域具有约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa的长度。

[0202] 在一些情况下，共刺激结构域来自扩膜蛋白BTLA (也称为BTLA1和CD272) 的胞内部分。例如，合适的共刺激结构域可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPD

[0203] LCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSHVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:66)。

[0204] 在一些情况下，共刺激结构域来自扩膜蛋白CD27 (也称为S152、T14、TNFRSF7和Tp55) 的胞内部分。例如，合适的共刺激结构域可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0205] HQRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

(SEQ ID NO:67)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽二者的共刺激结构域具有约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa的长度。

[0206] 在一些情况下,共刺激结构域来自扩膜蛋白CD30(也称为TNFRSF8、D1以下氨基酸S166E和Ki-1)的胞内部分。例如,合适的共刺激结构域可包含与序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、约150aa至约160aa、或约160aa至约185aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

RRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMS
QPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKA
[0207] DTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSV
EEEGKEDPLPTAASGK (SEQ ID NO:68)。

[0208] 在一些情况下,共刺激结构域来自扩膜蛋白GITR(也称为TNFRSF18、RP5-902P8.2、AITR、CD357和GITR-D)的胞内部分。例如,合适的共刺激结构域可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0209] HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPPEERGERSAEEKGRLGDLWV

(SEQ ID NO:69)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽二者的共刺激结构域具有约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa的长度。

[0210] 在一些情况下,共刺激结构域来自扩膜蛋白HVEM(也称为TNFRSF14、RP3-395M20.6、ATAR、CD270、HVEA、HVEM、LIGHTR和TR2)的胞内部分。例如,合适的共刺激结构域可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0211] CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRS

PNH (SEQ ID NO:70)。在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽二者的共刺激结构域具有约30aa至约35aa、约35aa至约40aa、约40aa至约45aa、约45aa至约50aa、约50aa至约55aa、约55aa至约60aa、约60aa至约65aa、或约65aa至约70aa的长度。

[0212] 二聚体对

[0213] 适合用于本发明CAR的二聚体对包括二聚化剂结合对。适合用于本公开的CAR的二聚化剂结合对在一些实施方案中是与同一分子(本文中称为“二聚化剂(dimerizer)”)的不同位点结合的多肽。在二聚化剂的存在下,二聚化剂结合对的两个成员与二聚化剂的不同点位结合从而彼此接近。在一些实施方案中,与二聚化剂的结合是可逆的。在一些实施方案中,与二聚化剂的结合是不可逆的。在一些实施方案中,与二聚化剂的结合是非共价的。在一些实施方案中,与二聚化剂的结合是共价的。

[0214] 另一些适合使用的二聚体对包括在二聚体对的第一成员与二聚化剂结合后二

聚化的二聚化剂结合对,其中二聚化剂诱导二聚体对的第一成员的构象变化,并且其中构象变化使得二聚体对的第一成员能够与二聚体对的第二成员结合(共价或非共价)。

[0215] 另一些适合使用的二聚体对包括其中暴露于光(例如,蓝光)诱导二聚体对的二聚化的二聚体对。

[0216] 无论机制如何,二聚体对将在暴露于诱导二聚化的试剂后二聚化,其中该试剂在一些情况下是小分子,或者在另一些情况下是光。因此,为了简化起见,以下关于“二聚化剂结合对”的讨论包括二聚化的二聚体对,而无论机制如何。

[0217] 合适的二聚体(例如,二聚化剂结合对)的非限制性实例包括但不限于:

[0218] a) FK506结合蛋白(FKBP)和FKBP;

[0219] b) FKBP和钙调磷酸酶催化亚基A(CnA);

[0220] c) FKBP和亲环素;

[0221] d) FKBP和FKBP-雷帕霉素相关蛋白(FRB);

[0222] e) 旋转酶B(GyrB)和GyrB;

[0223] f) 二氢叶酸还原酶(DHFR)和DHFR;

[0224] g) DmrB和DmrB;

[0225] h) PYL和ABI;

[0226] i) Cry2和CIB1;以及

[0227] j) GAI和GID1。

[0228] 本发明CAR的二聚体(例如,二聚化剂结合对)的第一或第二成员可具有约50个氨基酸至约300个氨基酸或更长的长度;例如,本发明CAR的二聚体(例如,二聚化剂结合对)的第一或第二成员可具有约50aa至约100aa、约100aa至约150aa、约150aa至约200aa、约200aa至约250aa、约250aa至约300aa、或超过300aa的长度。

[0229] 在一些情况下,本发明CAR的二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自FKBP。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQE

[0230] VIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (SEQ ID NO:12)。

[0231] 在一些情况下,本发明CAR的二聚化剂结合对的成员来自钙调磷酸酶催化亚基A(也称为PPP3CA;CALN;CALNA;CALNA1;CCN1;CNA1;PPP2B;CAM-PRP催化亚基;钙调磷酸酶A α ;钙调蛋白依赖性钙调磷酸酶A亚基 α 同种型;蛋白磷酸酶2B,催化亚基 α 同种型等)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列(PP2Ac结构域)具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0232] LEESVALRIITEGASILRQEKNLLDIDAPVTVCGDIHGQFFDLMKLFEVGGSPANTRY
LFLGDYVDRGYFSIECVLYLWALKILYPKTLFLLRGNHECRHLTEYFTFKQECKIKY
SERVYDACMDAFDCLPLAALMNQQFLCVHGGLSPEINTLDDIRKLDRFKEPPAYGP
MCDILWSDPLEDFGNEKTQEHFTHNTVRGCSYFYSYPAVCEFLQHNNLLSILRAHE
AQDAGYRMYRKSQTTGFPSLITIFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENNVMNIRQFNCSP
HPYWLPNFM (SEQ ID NO:71)。

[0233] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自亲环蛋白(也称为亲环蛋白A、PPIA、CYPA、CYPH、PPIase A等)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0234] MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKYGSCFHRII
PGFMCQGGDFTRHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFI
CTAKTEWLDGKHVVFVGKVKEGMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLE (SEQ
ID NO:72)。

[0235] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自MTOR(也称为FKBP-雷帕霉素相关蛋白;FK506结合蛋白12-雷帕霉素相关蛋白1;FK506结合蛋白12-雷帕霉素相关蛋白2;FK506-结合蛋白12-雷帕霉素复合物相关蛋白1;FRAP;FRAP1;FRAP2;RAFT1;和RAPT1)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列(也称为“Frb”:Fkbp-雷帕霉素结合结构域)具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0236] MILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQA
YGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO:14)。

[0237] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自GyrB(也称为DNA旋转酶亚基B)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的GyrB氨基酸序列(或来自任何生物体的DNA旋转酶亚基B序列)的约100个氨基酸至约200个氨基酸(aa)、约200aa至约300aa、约300aa至约400aa、约400aa至约500aa、约500aa至约600aa、约600aa至约700aa、或约700aa至约800aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MSNSYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGDIDDGTGLHHMVFEVVDNAIDEALAGH
 CKEIIVTIHADNSVSVQDDGRGIPTGIHPEEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDNSYKVS
 GGLHGVGVSVVNALSQKLELVIQREGKIHRQIYEHGVPQAPLAVTGETEKTGTMV
 RFWPSLETFTNVTEFEYEILAKRLRELSFLNSGV SIRLRDKRDGKEDHFHYEGGIKAF
 VEYLNKNKTPIHPNIFYFSTEKDGIGVEVALQWNDGFQENIYCFTNNIPQRDGGTHL
 AGFRAAMTRTLNAYMDKEGYSKKAKVSATGDDAREGLIAVVSVKVPDPKFSSQT

[0238] KDKLVSSEVKS SAVEQQMNELLA EYLLENPTDAKIVVGKIIDAARAREARRAREM
 TRRKGALDLA GLPGLADDCQERDPALSEL YLVEGDSAGGSAKQGRNRKNQAILPL
 KGKILNVEKARFDKMLSSQEVATLITALGCGIGRDEYNPDKLRYHSIIIMTDADVDG
 SHIRTLTLLTFFYRQMPEIVERGHVYIAQPPLYKVKKGKQEYIKDDEAMDQYQISIA
 LDGATLHTNASAPALAGEALEKLVSEYNATQKMINRMERRY PKAMLKELIYQPTL
 TEADLSDEQTVTRWVNALVSELNDKEQHGSQWKFDVHTNAEQNLFEPIVRVVRTHG
 VDTDYPLDHEFITGGEYRRIC TLGEKLRGLLEEDAFIERGERRQPVASFEQALDWLV
 KESRRGLSIQRYKGLGEMNPEQLWETTMDPESRRMLRVTVKDAIAADQLFTTLMG
 DAVEPRRAFIEENALKAANIDI (SEQ ID NO:73)。

在一些情况下,二聚化剂结合对成员包含于上文所列来自大肠杆菌的GyrB氨基酸序列的1-220氨基酸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0239] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自DHFR(也称为二氢叶酸还原酶、DHFRP1和DYR)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0240] MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGK
 KTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDM
 VWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLS
 DVQEEKGIKYKFEVYEKND (SEQ ID NO:74)。

[0241] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自DmrB结合结构域(即,DmrB同源二聚化结构域)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0242] MASRGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLG
 KQEVIRGWEEGVAQMSVGRQAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE
 (SEQ ID NO:75)。

[0243] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自PYL蛋白(也称为脱落酸受体和RCAR)。例如,本发明二聚化剂结合对的成员可来自例如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的那些蛋白质:PYR1、RCAR1(PYL9)、PYL1、PYL2、PYL3、PYL4、PYL5、PYL6、PYL7、PYL8(RCAR3)、PYL10、PYL11、PYL12、PYL13。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约

98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

- [0244] PYL10:
MNGDETKKVESEYIKKHHRHVESQCSSTLVKHIKAPLHLVWSIVRRFDEPQKYK
PFISRCVVQGGKLEVGSVREVDLKSGLPATKSTEVLEILDDNEHILGIRIVGGDHRLK
[0245] NYSSTISLHSETIDGKTGTLAIESFVVDVPEGNTKEETCFFVEALIQC�NLNSLADVTE
RLQAESMEKKI (SEQ ID NO:76)。
- [0246] PYL11:
METSQKYHTCGSTLVQTIDAPLSLVWSILRRFDNPQAYKQFVKTCNLSSGDGGEGS
VREVTVVSGLPAEFSRERLDELDDESHVMMISIIGGDHRLVNYSRKTMAFVAADTE
[0247] EKTVVVESYVVDVPEGNSEEETTSFADTIVGFNLKSLAKLSERVAHLKL (SEQ ID
NO:77)
- [0248] PYL12:
MKTSQEQHVCGSTVVQTINAPLPLVWSILRRFDNPKTFKHFVKTCCLRSGDGGEGS
VREVTVVSDDLPAFSLERLDELDDESHVMVISIIGGDHRLVNYQSKTTVFVAAEEEEK
[0249] TVVVESYVVDVPEGNTTEETTLFADTIVGC�LRSKSLAKLSEKMMELT (SEQ ID
NO:78)。
- [0250] PYL13:
MESSKQKRCRSSVETIEAPLPLVWSILRSFDKPQAYQRFVKCTMRSGGGGGKGG
EGKGSVRDVTLVSGFPADFSTERLEELDDESHVMVSIIGGNHRLVNYKSKTKVVA
[0251] SPEDMAKKTVVVESYVVDVPEGTSEEDTIFFVDNIIRYNLTSKSLAKLTKKMMK (SEQ
ID NO:79)。
- [0252] PYL1:
MANSESSSSPVNEEENSQRISTLHHQTMPSDLTQDEFTQLSQSIAEFHTYQLGNGRC
SSLLAQRIHAPPETVWSVRRFDRPQIYKHFIKSCNVSEDFEMRVGCTRDVNVISGL
[0253] PANTSRELDLLDDRRVTGFSITGGEHRLRNYKSVTTVHRFEKEEEEEERIWTVVLE
SYVVDVPEGNSEEDTRLFADTVIRLNQKLASITEAMNRNNNNNNSSQVR (SEQ ID
NO:80)。
- [0254] PYL2:
MSSSPAVKGLTDEEQKTLEPVIKTYHQFEPDPTTCTSLITQRIHAPASVWPLIRRF
NPERYKHFVKRCRLISGDGDVGSVREVTVISGLPASTSTERLEFVDDHRLVLSFRVV
[0255] GGEHRLKNYKSVTSVNEFLNQDSGKVYTVVLESYTVDIPEGNTEEDTKMFVDTVV
KLNQKLGVAATSAPMHDDE (SEQ ID NO:81)。
- [0256] PYL3:
MNLAPIHDPSSSSTTTTSSSTPYGLTKDEFSTLDSIIRTHHTFPRSPNTCTSLIAHRVDA
PAHAIWRFVRDFANPNKYKHFIKSCIRVNGNGIKEIKVGTIREVSVVSGLPASTSVE
[0257] ILEVLDDEEKRILSFRVLGGEHRLNNYSVTSVNEFVVLEKDKKKRVYSVVLESYVD
IPQGNTEEDTRMFVDTVVKSNLQNLAVISTASPT (SEQ ID NO:82)。
- [0258] PYL4:

- [0259] MLAVHRPSSAVSDGDSVQIPMMIASFQKRFP SL SRDSTAARFHTHEVGNQCCSAVI
 QEISAPISTVWSVRRFDNPQAYKHFLKSCSVIGGDGDNVGLRQVHVVSGLPAAS
 STERLDILDDERHVISFSVGGDHRLSNYRSVTTLHPSISGTVVVE SYVVDVPPGNT
 KEETCDFVDVIVRCNLQSLAKIAENTA AESKKKMSL (SEQ ID NO:83)。
- [0260] PYL5:
 MRSPVQLQHGS DATNGFHTLQPHDQTDGPIKRVCLTRGMHVPEHVAMHHTHDVG
 PDQCCSSVVQMIHAPPESVWALVRRFDNPKVYKNFIRQCRIVQGDGLHVVDLREV
 [0261] MVVSGLPAVSS TERLEILDEERHVISFSVGGDHRLKNYRSVTTLHASDDEGTVVV
 ESYIVDVPPGNT EETLSFVDTIVRCNLQSLARSTNRQ (SEQ ID NO:84)。
- [0262] PYL6:
 MPTSIQFQRSSTAAEAANATVRNYPHHHQKQVQVSLTRGMADVPEHVELSHTHV
 VGPSQCFSVVVQDVEAPVSTVWSILSRFEHPQAYKHFVKSCHVIGDGREVGSVRE
 [0263] VRVVSGLPAAFSLERLEIMDDDRHVISFSVGGDHRLMNYKSVTTVHESEEDSDGK
 KRTRVVESYVVDVPAGNDKEETCSFADTIVRCNLQSLAKLAENTSKFS (SEQ ID
 NO:85)。
- [0264] PYL7:
 MEMIGGDDTDTEMYGALVTAQSLRLRHLHHCRENQCTSVLVKYIQAPVHLVWSL
 VRRFDQPQKYKPFISRCTVNGDPEIGCLREVN VKSGLPATTSTERLEQLDDEEHILGI
 [0265] NIIGGDHRLKNYSSILTVHPEMIDGRSGTMVMESFVVDVPQGNTKDDTCYFVESLIK
 CNLKSLACV SERLAAQDITNSIATFCNASNGYREKNHTETNL (SEQ ID NO:86)。
- [0266] PYL8:
 MEANGIENLTNPNQEREFIRRHKKHELVDNQCSTLVKHINAPVHIVWSLVRRFDQ
 PQKYKPFISRCVVKGNMEIGTVREVDVKSGLPATRSTERLELLDDEEHILSIRVGGD
 [0267] HRLKNYSSIISLHPETIEGRIGTLVIESFVVDVPEGNTKDETCYFVEALIKCNLKSLAD
 ISERLAVQDTTESRV (SEQ ID NO:87)。
- [0268] PYL9:
 MMDGVEGGTAMYGGLETVQYVRTTHQHLCRENQCTSALVKHIKAPLHLVWSLV
 RRFDPQKYKPFVSRCTVIGDPEIGSLREVN VKSGLPATTSTERLELLDDEEHILGIKI
 [0269] IGGDHRLKNYSSILTVHPEIIEGRAGTMVIESFVVDVPQGNTKDETCYFVEALIRCNL
 KSLADV SERLASQDITQ (SEQ ID NO:88)。
- [0270] PYR1:
 MPSELTPEERSELKNSIAEFHTYQLDPGSCSSLHAQRIHAPPELVWSIVRRFDKPQTY
 KHFIKSCSVEQNFEMRVGCTRDVIVISGLPANTSTERLDILDDERRVTGFSIIGGEHR
 [0271] LTNYKSVTTVHRFEKENRIWTVVLESYVVDMPGNS EDDTRMFADTVVKLNLQKL
 ATVAEAMARNSGDGSGSQVT (SEQ ID NO:89)。
- [0272] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自ABI蛋白(也称为脱落酸不敏感(Abscisic Acid-Insensitive))。例如,本发明二聚化剂结合对的成员可来自例如拟南芥的那些蛋白质:ABI1(也称为脱落酸不敏感1、蛋白磷酸酶2C 56,AtPP2C56、P2C56和PP2C ABI1)和/或ABI2(也称为P2C77、蛋白磷酸酶2C 77、AtPP2C77、脱落酸不敏感2、蛋白

磷酸酶2C ABI2和PP2C ABI2)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列中任一个的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、约150aa至约160aa、约160aa至约170aa、约170aa至约180aa、约180aa至约190aa、或约190aa至约200aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0273] ABI1:

MEEVSPAIAAGPFRPFSETQMDFTGIRLGKGYCNNQYSNQDSENGDLMVSLPETSSCS
VSGSHGSESRKVLISRINSPNLNMKESAAADIVVVDISAGDEINGSDITSEKKMISRT
ESRSLFEFKSVPLYGFTSICGRRPEMEDAVSTIPRFLQSSSGSMLDGRFDPQSAAHFF
GVYDGHGGSQVANYCRERMHLALAEIEAKEKPMLCDGDTWLEKWKKALFNSFLR
VDSEIESVAPETVGSTSVVAVVFP SHIFVANC GDSRAVLCRGKTALPLSVDHKPDRE
DEAARIEAAGGKVIQWNGARVFGVLAMRSIGDRYLKPSIIPDPEVTAVKRVKEDD
CLILASDGVWDVMTDEEACEMARKRILLWHKKNNAVAGDASLLADERRKEGKDPA
AMSAAEYLSKLAIQRGSKDNISVVVVDLKP RRKLKSKPLN (SEQ ID NO:90)。

[0275] ABI2:

MDEVSPA VAVPFRPFTDPHAGLRGYCNGESRVTLPESSCSGDGAMKDSSFEINTRQ
DSL TSSSSAMAGVDISAGDEINGSDEFDPRSMNQSEKKVLSRTE SRSLFEFKCVPLY
GVTSICGRRPEMEDSVSTIPRFLQVSSSSLLDGRVTNGFNPHLSAHFFGVYDGHGGS
QVANYCRERMHLALTEEIVKEKPEFCDGDTWQEKWKKALFNSFMRVDSEIETVAH
APETVGSTSVVAVVFP THIFVANC GDSRAVLCRGKTPLALSVDHKPDRDDEAARIE
AAGGKVIRWNGARVFGVLAMRSIGDRYLKPSVIPDPEVTSVRRVKEDDCLILASD
GLWDVMTNEEVCDLARKRILLWHKKNAMAGEALLPAEKRGEGKDPAAMSAAEY
LSKMALQKGSKDNISVVVVDLKGIRKFKSKSLN (SEQ ID NO:91)。

[0277] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自Cry2蛋白(也称为隐花色素2)。例如,本发明二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员可来自任何生物体(例如,植物)的Cry2蛋白,例如,包括但不限于拟南芥的那些。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列中任一个的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、约150aa至约160aa、约160aa至约170aa、约170aa至约180aa、约180aa至约190aa、或约190aa至约200aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0278] Cry2(拟南芥)

[0279] MKMDKKTIVWFRRLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYPGRASRWW
 MKQSLAHLSQLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNHLYDPVSLVRD
 HTVKEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGPFTSFNSYWKCLDMSIESVML
 PPPWRLMPITAAAEAIWACSI EELGLENEAEKPSNALLTRAWSPGWSNADKLLNEFI
 EKQLIDYAKNSKKVVG NSTSLLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSEGE
 ESADLFLRGIGLREYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKAWRQGRGTG
 YPLVDAGMRELWATGWMHNRIRVIVSSFAVKFLLLPWKWGMKYFWDTLLDADL
 ECDILGWQYISGSIPDGHELDRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPELARLPTEWIHH
 PWDAPLTVLKASGVELGTNYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAAPDEIVA
 DSFEALGANTIKEPGLCPSVSSNDQQVPSAVRYNGSKRVKPEEEEEERDMKKS RGF
 ERELSTAESSSSSVFFVSQCSLASEGKNLEGIQDSSDQITTS LGKNGCK (SEQ ID
 NO:92)。

[0280] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自CIB1拟南芥蛋白(也称为转录因子bHLH63)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、约150aa至约160aa、约160aa至约170aa、约170aa至约180aa、约180aa至约190aa、或约190aa至约200aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0281] MNGAIGGDLNFPDMSVLERQRAHLKYLNPTFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYL
 STAGLNLPMMYGETTVEGDSRLSISPETTLGTGNFKRKFDTETKDCNEKKKKMT
 MNRDDLVEEGEEKSKITEQNGSTKSIKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKLEKT
 DYIHVRARRGQATDSHSIAERVRREKISERMKFLQDLVPGCDKITGKAGMLDEIINY
 VQSLQRQIEFLSMKLAIVNPRPDFMDDDIFAKEVASTPMTVVPSPPEMVLGYSHEM
 VHSGYSSEM VNSGYLHV NPMQQVNTSSDPLSCFNNGEAPSMWDSHVQNLYGNLGV
 V (SEQ ID NO:93)。

[0282] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自GAI拟南芥蛋白(也称为赤霉素不敏感和DELLA蛋白GAI)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、约150aa至约160aa、约160aa至约170aa、约170aa至约180aa、约180aa至约190aa、或约190aa至约200aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0283] MKRDHHHHHHQDKKTMMMNEEDDGNGMDELLAVLGYKVRSEMADVAQKLEQ
 LEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTDLNPPSSNAEYDLKAIPG
 DAILNQFAIDSASSSNQGGGGDTYTNTKRLKCSNGVVETTTATAESTRHVVLVDSQ
 ENGVRLVHALLACAEAVQKENLTVAEALVKQIGFLAVSQIGAMRKVATYFAEALA
 RRIYRLSPSQSPIDHSLSDTLQMHFYETCPYLKFAHFTANQAILEAFQGKKRVHVIDF
 SMSQGLQWPALMQALALRPGGPPVFRLTGIGPPAPDNFDYLHEVGCKLAHLAEAIH
 VEFYRGFVANTLADLDASMLELRPSEIESVAVNSVFELHKLGRPGAIKVLGVV
 NQIKPEIFTVVEQESNHNSPIFLDRFTESLHYYSTLFDSLEGVPSGQDKVMSEVYLGK
 QICNVVACDGPDRVERHETLSQWRNRFGSAGFAAAHIGSNAFKQASMLLALFNGG
 EGYRVEESDGCLMLGWHTRPLIATS AWKLSTN (SEQ ID NO:94)。

[0284] 在一些情况下,二聚体(例如,二聚化剂结合对)的成员来自GID1拟南芥蛋白(也称为赤霉素受体GID1)。例如,合适的二聚化剂结合对成员可包含与以下氨基酸序列中的任意一个的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、约150aa至约160aa、约160aa至约170aa、约170aa至约180aa、约180aa至约190aa、或约190aa至约200aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0285] GID1A:

MAASDEVNLIERTVPLNTWVLISNFKVAYNILRRPDGTFNRHLAEYLDRKVTAN
 ANPVDGVVFSFDVLIDRRINLLSRVYRPAYADQEQPPSILDLEKPVGDIVPVILFFHG
 GSFAHSSANS AIYDTLCRRLVGLCKCVVSVNYRRAPENPYPCAYDDGWIALNWV
 [0286] NSRSWLKSKKDSKVHIFLAGDSSGGNIAHNVALRAGESGIDVLGNILLNPMFGGNE
 RTESEKSLDGKYFVTVRDRDWYWKAFLEPEGEDREHPACNPFSPRGKSLEGVSFPKS
 LVVVAGLDLIRDWQLAYAEGLKKAGQEVKLMHLEKATVGFYLLPNNNHFHNV
 DEISAFVNAEC (SEQ ID NO:95)。

[0287] GID1B:

MAGGNEVNLNECKRIVPLNTWVLISNFKLAYKVLRRPDGTFNRDLAEFLDRKVP
 NSFPLDGVVFSFDHVDSTTNLLTRIYQPASLLHQTRHGTLELTKPLSTTEIVPVLIFFHG
 GSFTHSSANS AIYDTFCRRLVTICGVVVVSVDYRRSPEHRYPCAYDDGWALNWV
 [0288] KSRVWLQSGKDSNVVYLAGDSSGGNIAHNVAVRATNEGKVLGNILLHMPFGG
 QERTQSEKTLDGKYFVTIQDRDWYWRAYLPEGEDRDHPACNPFGRGQSLKGVNF
 PKSLVVVAGLDLVQDWQLAYVDGLKKTGLEVNLLYLKQATIGFYFLPNNNDHFHCL
 MEELNKFVHSIEDSQSKSSPVLLTP (SEQ ID NO:96)

[0289] GID1C:

[0290] MAGSEEVNLIESKTVVPLNTWVLISNFKLAYNLLRRPDGTFNRHLAEFLDRKVPAN
 ANPVNGVFSFDVIIDRQTNLLSRVYRPADAGTSPSITDLQNPVDGEIVPVIVFFHGGG
 FAHSSANSAYDTLCRRLVGLCGAVVVSVNRYRRAPENRYPCAYDDGWAVLKWVN
 SSSWLRSKKDSKVRIFLAGDSSGNIHVNVAVRAVESRIDVLGNILLNPMFGGTERT
 ESEKRLDGKYFVTVRDRDWYWRAFLPEGEDREHPACSPFGPRSKSLEGLSFPKSLV
 VVAGLDLIQDWQLKYAEGKKAGQEVKLLYLEQATIGFYLLPNNNHFTVMDEIA
 AFVNAECQ (SEQ ID NO:97)。

[0291] 二聚化剂

[0292] 可提供用于二聚化剂结合对的第一成员与二聚化剂结合对的第二成员的二聚化的二聚化剂包括例如(其中二聚化剂是以下二聚化剂结合对的括号内内容:

[0293] a) FKBP和FKBP(雷帕霉素);

[0294] b) FKBP和CnA(雷帕霉素);

[0295] c) FKBP和亲环蛋白(雷帕霉素);

[0296] d) FKBP和FRG(雷帕霉素);

[0297] e) GyrB和GyrB(库马霉素);

[0298] f) DHFR和DHFR(甲氨蝶呤);

[0299] g) DmrB和DmrB(AP20187);

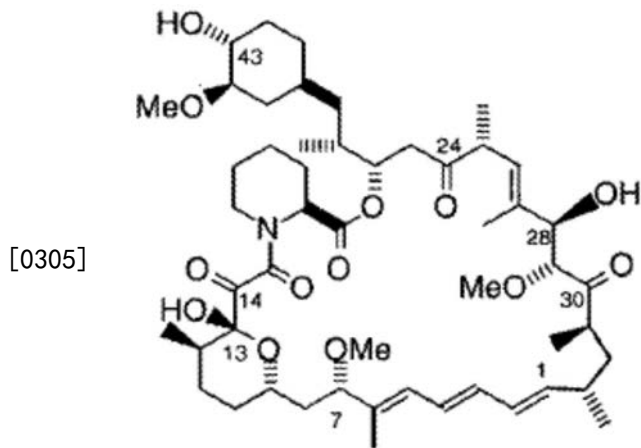
[0300] h) PYL和ABI(脱落酸);

[0301] i) Cry2和CIB1(蓝光);和

[0302] j) GAI和GID1(赤霉素)。

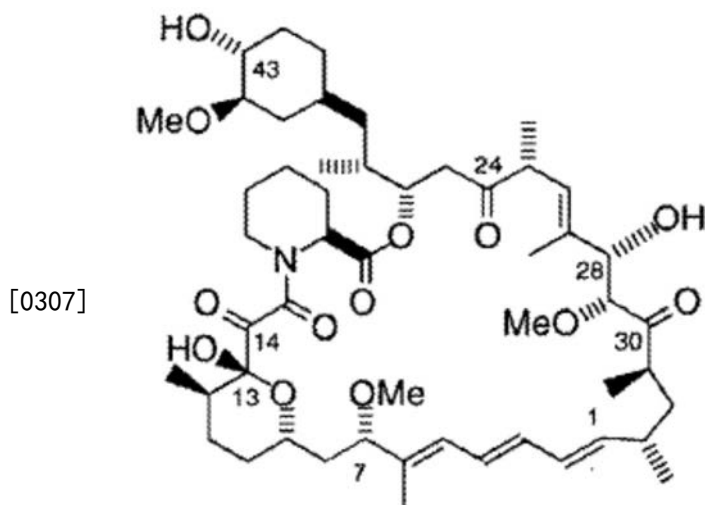
[0303] 如上所述,雷帕霉素可作为二聚化剂。或者,可使用雷帕霉素或其衍生物。参见,例如W096/41865、W0 99/36553、W0 01/14387,以及Ye等(1999) Science 283:88-91。例如,在结构上与雷帕霉素相关的类似物、同系物、衍生物及其他化合物(“雷帕霉素类(rapalog)”)特别包括与雷帕霉素相比具有一个或多个以下变化的雷帕霉素变体:脱甲基,移除或替换C7、C42和/或C29的甲氧基;移除、衍生化或替换C13、C43和/或C28的氢;还原、移除或衍生化C14、C24和/或C30的酮;将6元嘧啶酸环替换成5元脯氨酰基环;以及在环己基环上可选取代或将环己基环替换成经取代的环戊基环。额外的信息存在于例如美国专利号5,525,610、5,310,903 5,362,718和5,527,907中。已经描述了C-28羟基的选择性差向异构化,参见例如W001/14387。适合用作雷帕霉素的替代物的额外的合成二聚化剂包括美国专利公开2012/0130076中描述的那些。

[0304] 雷帕霉素具有以下结构:



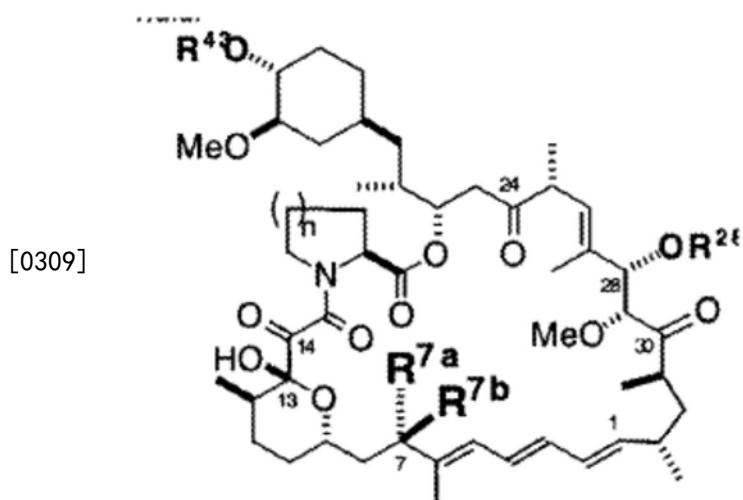
雷帕霉素

[0306] 合适的雷帕霉素类包括,例如



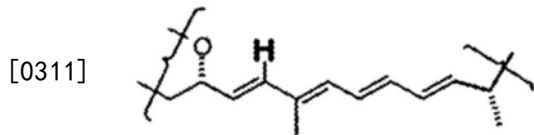
28-异雷帕霉素

[0308] 同样适合于作为雷帕霉素类的是下式的化合物:



[0310] 其中n是1或2; R^{28} 和 R^{43} 独立地为H,或者经取代或未经取代的脂肪族基或酰基部分; R^{7a} 和 R^{7b} 之一是,另一个是卤素、 R^A 、 OR^A 、 SR^A 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-OC(O)NR^A R^B$ 、 $-NR^A R^B$ 、 $-NR^B C(OR)R^A$ 、

$\text{NR}^{\text{B}}\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{B}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 或 $\text{NR}^{\text{B}}\text{SO}_2\text{NR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{B}'}$ ；或者 $\text{R}^{7\text{a}}$ 和 $\text{R}^{7\text{b}}$ 一起是四烯部分中的H：



[0312] 其中 R^{A} 是H,或者经取代或未经取代的脂肪族基、杂脂肪族基、芳基或杂芳基部分,并且其中 R^{B} 和 $\text{R}^{\text{B}'}$ 独立地为H、OH,或者经取代或未经取代的脂肪族基、杂脂肪族基、芳基或杂芳基部分。

[0313] 如上所述,库马霉素可作为二聚化剂。或者,可使用库马霉素类似物。参见例如Farrar等.(1996)Nature 383:178-181和美国专利号6,916,846。

[0314] 如上所述,在一些情况下,二聚化剂是甲氨蝶呤,例如无细胞毒性的同-双官能甲氨蝶呤二聚体。参见,例如美国专利号8,236,925。

[0315] 胞内信号结构域

[0316] 适合用于本公开的CAR的胞内信号结构域包括在响应于CAR的激活(即,被抗原和二聚化剂激活)时提供明显的可检测信号(例如,细胞的一种或多种细胞因子的产生增加;靶基因的转录改变;蛋白质活性改变;细胞行为改变,例如,细胞死亡;细胞增殖;细胞分化;细胞存活;细胞信号响应的调节等)的任何期望的信号结构域。在一些实施方案中,胞内信号结构域包含至少一(例如,1、2、3、4、5、6等)个下文所述ITAM基序。在一些实施方案中,胞内信号结构域包含DAP10/CD28型信号链。在一些实施方案中,胞内信号结构域未与膜结合的CAR共价连接,而是分散在细胞质中。

[0317] ITAM

[0318] 适合用于本公开的CAR的胞内信号结构域包括含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞内信号结构域。ITAM基序是 $\text{YX}_1\text{X}_2\text{L/I}$,其中 X_1 和 X_2 独立地为任何氨基酸(SEQ ID NO:130)。在一些情况下,本发明CAR的胞内信号结构域含有1、2、3、4或5个ITAM基序。在一些情况下,ITAM基序在胞内信号结构域中重复两次,其中第一ITAM基序实体与第二ITAM基序实体彼此被6至8个氨基酸隔开,例如, $(\text{YX}_1\text{X}_2\text{L/I})(\text{X}_3)_n(\text{YX}_1\text{X}_2\text{L/I})$,其中 n 是6至8的整数,并且6至8个 X_3 中的每一个均可以使任何氨基酸(SEQ ID NO:131)。在一些情况下,本发明CAR的胞内信号结构域包含3个ITAM基序。

[0319] 合适的胞内信号结构域可以是来自含ITAM基序的多肽的含有ITAM基序的部分。例如,合适的胞内信号结构域可以是来自任意含ITAM基序的多肽的含有ITAM基序的结构域。因此,合适的胞内信号结构域不需要包含获得结构域的整体蛋白质的整个序列。合适的含ITAM基序的多肽的实例包括但不限于:DAP12;FCER1G(Fcε受体Iγ链);CD3D(CD3δ);CD3E(CD3ε);CD3G(CD3γ);CD3Z(CD3ζ);和CD79A(抗原受体复合物相关蛋白α链)。

[0320] 在一些情况下,胞内信号结构域来自DAP12(也称为TYROBP;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;KARAP;PLOS;DNAX-激活蛋白12;KAR-相关蛋白;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;杀伤细胞激活受体相关蛋白;杀伤激活受体相关蛋白等)。例如,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列(4种亚型)中的任意一种具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLI
ALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYOELQGQRSDVYSDLNTQRPYY
K (SEQ ID NO:98);

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLI
ALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYOELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK

[0321] (SEQ ID NO:99);

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLI
ALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYOELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID
NO:100); 或

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLI
ALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYOELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO:101),

[0322] 其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0323] 同样地,合适的胞内信号结构域多肽可包含全长DAP12氨基酸序列的含有ITAM基序的部分。因此,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0324] **ESPYOELQGQRSDVYSDLNTQ** (SEQ ID NO:102) ,

其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0325] 在一些情况下,细胞内限号结构域来自FCER1G(也称为FCRG;Fcε受体Iγ链;Fc受体γ链;fc-εRI-γ;fcRγ;fceRIγ;高亲和力免疫球蛋白ε受体γ亚基;免疫球蛋白E受体高亲和力γ链等)。例如,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0326] MIPAVVLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLTYCRLKIQRKAAITSY
EKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ (SEQ ID NO:103) ,

其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0327] 同样地,合适的胞内信号结构域多肽可包含全长FCER1G氨基酸序列的含有ITAM基序的部分。因此,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0328] **DGVYTGLSTRNQETYETLKHE** (SEQ ID NO:104) ,

其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0329] 在一些情况下,细胞内限号结构域来自T细胞表面糖蛋白CD3δ链(也称为CD3D;CD3-δ;T3D;CD3抗原δ亚基;CD3δ;CD3d抗原δ多肽(TiT3复合物);OKT3,δ链;T细胞受体T3δ链;T细胞表面糖蛋白CD3δ链等)。例如,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列(2种亚型)中的任意一个的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、或约150aa至约170aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、

至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRL
 [0330] DLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIAT
 LLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQV**YOPL**RDRDDA**QYSHL**GGNWAR
 NK (SEQ ID NO:105) 或

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRL
 [0331] DLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRNDQV**YOPL**RDRDD
AQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO:106), 其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0332] 同样地,合适的胞内信号结构域多肽可包含全长CD3 δ 氨基酸序列的含有ITAM基序的部分。因此,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0333] **DQVYOPLRDRDDAQYSHL**GGN (SEQ ID NO:107), 其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0334] 在一些情况下,细胞内限号结构域来自T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链(也称为CD3 ϵ 、T细胞表面抗原T3/Leu-4 ϵ 链、T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链、AI504783、CD3、CD3 ϵ 、T3 ϵ 等)。例如,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、或约150aa至约205aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MQSGTHWRVGLCLLSVGVWGDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSE
 [0335] ILWQHNDKNIGGEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYL
 YLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAG
AGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI (SEQ ID NO:108), 其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0336] 同样地,合适的胞内信号结构域多肽可包含全长CD3 ϵ 氨基酸序列的含有ITAM基序的部分。因此,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0337] **NPDYEPIRKGQRDLYSGL**NQR (SEQ ID NO:109), 其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0338] 在一些情况下,细胞内限号结构域来自T细胞表面糖蛋白CD3 γ 链(也称为CD3 γ 、T细胞受体T3 γ 链、CD3- γ 、T3 γ , γ 多肽(TiT3复合物)等)。例如,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、或约150aa至约180aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MEQKGGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWF
 [0339] KDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPGRMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIEL
 NAATISGFLFAEIVSIFVLA VGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDRE
 DDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO:110) ,

其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0340] 同样地,合适的胞内信号结构域多肽可包含全长CD3 γ 氨基酸序列的含有ITAM基序的部分。因此,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0341] **DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN** (SEQ ID NO:111) ,

其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0342] 在一些情况下,细胞内限号结构域来自T细胞表面糖蛋白CD3 δ 链(也称为CD3Z、T细胞受体T3 δ 链、CD247、CD3- δ 、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。例如,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列(两种亚型)中的任意一个的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、或约150aa至约160aa的连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRS
 [0343] ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 (SEQ ID NO:112) ,或

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRS
 [0344] ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYN
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(
 SEQ ID NO:113) ,其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0345] 同样地,合适的胞内信号结构域多肽可包含全长CD3 δ 氨基酸序列的含有ITAM基序的部分。因此,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNP
 [0346] QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
 ALPPR (SEQ ID NO:18);
 NQLYNELNLGRREEYDVLDKR (SEQ ID NO:114);

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK (SEQ ID NO:115);或

[0347] **DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ** (SEQ ID NO:116) ,其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0348] 在一些情况下,细胞内限号结构域来自CD79A(也称为B细胞抗原受体复合物相关蛋白 α ;CD79a抗原(免疫球蛋白相关 α);MB-1膜糖蛋白;ig- α ;膜结合免疫球蛋白相关蛋白;表面IgM相关蛋白等)。例如,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列(2种亚型)中的任意一个的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110aa至约115aa、约115aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约150aa、约150aa至约200aa、或约200aa至约220aa连续延伸具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0349] MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDA
HFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKSHTGGIYV
CRVQEGNESYQQSCGTYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCVAVPGTLL
LFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLN
IGDVQLEKP (SEQ ID NO:117);或

[0350] MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDA
HFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTPPEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGTKNR
IITAEGIILLFCVAVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYE
DISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:118),其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0351] 同样地,合适的胞内信号结构域多肽可包含全长CD79A氨基酸序列的含有ITAM基序的部分。因此,合适的胞内信号结构域多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: **ENLYEGLNLDDCSMYEDISR**G (SEQ ID NO:119),其中ITAM基序是粗体并且具有下划线。

[0352] DAP10/CD28

[0353] 适合用于本公开的CAR的胞内信号结构域包括DAP10/CD28型信号链。

[0354] DAP10信号链的实例是如下的氨基酸序列: **RPRRSPAQDGKVIYNMPGRG** (SEQ ID NO:120)。在一些实施方案中,合适的胞内信号结构域包含与氨基酸序列

RPRRSPAQDGKVIYNMPGRG (SEQ ID NO:120) 的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0355] CD28信号链的实例是如下的氨基酸序列:

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ
PYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:121)。在一些实施方案中,合适的胞内信号结构域包含与氨基酸序列
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ
PYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:121) 的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0356] ZAP70

[0357] 适合用于本公开的CAR的胞内信号结构域包括ZAP70多肽,例如包含与以下氨基酸序列的约300个氨基酸至约400个氨基酸、约400个氨基酸至约500个氨基酸、或约500个氨基

酸至619氨基酸的连续延伸的具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0358] MPDPA AHL PFFYGSISR AEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRS LGYVLSLVHDVRF
 HHFPIERQLNGTYAIAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRP SGLEPQPG
 VFDCLRDAMVRDYVRQ TWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSL
 TREEAERKLYSGAQT DGKFLLRPRKEQGT YALSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIP
 EGTKFDTLWQLVEYLK LKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAHPSTLTHP
 QRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLF LKRDNL
 LIADIELGCGNFGSVRQGVYRMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQ
 LDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLV GKREEIPVSNVAELLHQVSM
 GMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKW
 PLKWYAPECINFRKFSSRSVDVWSYGVTMWEALS YGQKPYKKMKGPEVMAFIEQG
 KRMECPPECPELYALMSDCWIYKWEDRPDFTLVEQRM RACYYSLASKVEGPPGS
 TQKAEAAACA (SEQ ID NO:36) .

[0359] 额外序列

[0360] 本发明CAR的第一多肽和/或第二多肽还可包含一个或更多个额外的多肽结构域，其中这样的结构域包括但不限于信号序列、表位标记、亲和结构域和产生可检测信号的多肽。

[0361] 信号序列

[0362] 适合用于本发明CAR (例如，本发明CAR的第一多肽) 的信号序列包括任何真核信号序列，包括天然存在的信号序列、合成 (例如人造) 信号序列等。

[0363] 表位标记

[0364] 合适的表位标记包括但不限于血凝素 (HA，例如YPYDVDPYA (SEQ ID NO:122)、FLAG (例如，DYKDDDDK (SEQ ID NO:123) ;c-myc (例如，EQKLISEEDL;SEQ ID NO:4) 等。

[0365] 亲和结构域

[0366] 亲和结构域包含可与结合伴侣 (例如，固定在固体表面上的结合伴侣) 接触用于识别或纯化的肽序列。编码多个连续单氨基酸 (例如，组氨酸) 的DNA序列在与表达的蛋白质融合时，可用于通过与树脂柱 (例如，镍琼脂糖) 高亲和力结合来一步纯化重组蛋白。示例性的亲和结构域包括His5 (HHHHH) (SEQ ID NO:124)、HisX6 (HHHHHH) (SEQ ID NO:125)、C-myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO:4)、Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:123)、StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:126)、血凝素如HA Tag (YPYDVDPYA) (SEQ ID NO:122)、GST、硫氧还原蛋白、纤维素结合结构域、RYIRS (SEQ ID NO:127)、Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO:128)、几丁质结合结构域、S-肽、T7肽、SH2结构域、C-末端RNA标签、WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:129)、金属结合结构域，例如锌结合结构域或钙结合结构域，例如来自钙结合蛋白 (例如钙调蛋白、肌钙蛋白C、钙调磷酸酶B、肌球蛋白轻链、恢复蛋白、S-调控蛋白、视锥蛋白、VILIP、神经钙蛋白、海马钙结合蛋白、聚集蛋白、钙牵蛋白、钙蛋白酶大亚基、S100蛋白、小清蛋白、钙结合蛋白D9K、钙结合蛋白D28K和钙网膜蛋白) 的那些，内含肽、生物素、链霉亲和素、MyoD、Id、亮氨酸拉链序列和麦芽糖结合蛋白。

[0367] 可检测信号产生多肽

[0368] 合适的可检测信号产生蛋白包括例如荧光蛋白、催化产生可检测信号作为产物的反应的酶等。

[0369] 合适的荧光蛋白包括但不限于：绿色荧光蛋白 (GFP) 及其变体、GFP的蓝色荧光蛋白 (BFP) 及其变体、GFP的青色荧光变体 (CFP)、GFP的黄色荧光变体 (CFP)、增强的GFP (EGFP)、增强的CFP (ECFP)、增强的YFP (EYFP)、GFPS65T、Emerald、Topaz (TYFP)、Venus、Citrine、mCitrine、GFPuv、稳定化的EGFP (dEGFP)、稳定化的ECFP (dECFP)、稳定化的EYFP (dEYFP)、mCFPm、Cerulean、T-Sapphire、CyPet、YPet、mK0、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、DsRed-单体、J-Red、dimer2、t-dimer2 (12)、mRFP1、pocilloporin、Renilla GFP、Monster GFP、paGFP、Kaede蛋白和kindling蛋白、藻胆蛋白和藻胆蛋白缀合物，包括B-藻红蛋白、R-藻红蛋白和别藻蓝蛋白。荧光蛋白的另一些实例包括mHoneydew、mBanana、mOrange、dTomato、tdTomato、mTangerine、mStrawberry、mCherry、mGrape1、mRaspberry、mGrape2、mPlum (Shaner等. (2005) Nat. Methods 2:905-909) 等。描述在例如Matz等. (1999) Nature Biotechnol. 17:969-973中的任何荧光蛋白和有色蛋白也适合使用。

[0370] 合适的酶包括但不限于辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AP)、 β -半乳糖苷酶 (GAL)、葡萄糖-6磷酸脱氢酶、 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶、蔗糖酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶、葡萄糖氧化酶 (GO) 等。

[0371] 序列重组

[0372] 在某些情况下，通过使用位点特异性重组技术，可使细胞中CAR的多肽的序列（例如，CAR结构域）重排或缺失。在某些实施方案中，通过位点特异性重组，细胞对于特定CAR的激活相关响应可改变，例如，引起第一激活相关响应的CAR的第一胞内信号结构域可与引起第二激活相关响应的第二胞内信号结构域交换。在某些情况下，通过位点特异性重组，CAR对于特定二聚剂的响应可改变，例如，在第一二聚化剂的存在下引起CAR二聚化的第一二聚化剂结合对可与在第二二聚化剂的存在下引起CAR二聚化的第二二聚化剂结合对交换。对于本领域技术人员来说清楚的是位点特异性重组可在细胞中用于将CAR的任何结构域或序列与本文公开的任何其他结构域或序列交换。另外，对于本领域技术人员来说清楚的是位点特异性重组可在细胞中用于使CAR的任何结构域或序列缺失。参见，例如Tone等. 在 (2013) Biotechnology and Bioengineering, 3219-3226中描述的domain switching in signalobodies, 其公开内容通过引用并入本文。用于体内进行位点特异性重组的机制和需求是本领域中公知的，参见例如Grindley等. (2006) Annual Review of Biochemistry, 567-605和Tropp (2012) Molecular Biology (Jones&Bartlett Publishers, Sudbury, MA), 其公开内容通过引用并入本文。

[0373] 核酸

[0374] 本公开提供了包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽和/或第二多肽的核苷酸序列的核酸。在一些实施方案中，包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽和/或第二多肽的核苷酸序列的核酸是DNA，包括例如重组表达载体。在一些实施方案中，包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽和/或第二多肽的核苷酸序列的核酸是RNA，例如，体外合成的RNA。

[0375] 在一些情况下，本公开的核酸包含仅编码本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽（不编码第二多肽）的核苷酸序列。在一些情况下，本公开的核酸包含仅编码本公开的

异二聚体条件激活CAR的第二多肽(不编码第一多肽)的核苷酸序列。在一些情况下,本公开的核酸包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽和第二多肽二者的核苷酸序列。

[0376] 在一些情况下,本发明核酸提供了在例如哺乳动物骨细胞中产生本公开的CAR。在另一些情况下,本发明提供了CAR编码核酸的扩增。

[0377] 编码本公开的CAR的第一多肽和/或第二多肽的核苷酸序列可与转录控制元件(例如,启动子和增强子等)可操作地连接。

[0378] 合适的启动子和增强子元件是本领域中已知的。对于在细菌细胞中表达,合适的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λ P、trc。对于在真核细胞中表达,合适的启动子包括但不限于轻和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件;巨细胞病毒立即早期启动子;单纯疱疹病毒腺苷激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;来自逆转录病毒的长末端重复中存在的启动子;以及各种本领域已知的组织特异性启动子。

[0379] 合适的可逆启动子包括本领域中已知的可逆可诱导启动子。这样的可逆启动子可分离或来源于任何有机体,例如真核生物和原核生物。对来源于第一有机体的可逆启动子进行修饰以用于第二有机体(例如,第一原核生物和第二真核生物,第一真核生物和第二原核生物等)是本领域中周知的。合适的可逆启动子以及基于这种可逆启动子但是还包含额外控制蛋白的系统包括不限于醇调剂启动子(例如,醇脱氢酶I(alcA)基因启动子,响应于醇反式激活蛋白(AlcR)的启动子)四环素调节启动子(例如,包含Tet活化剂、TetON、TetOFF等的启动子系统)、类固醇调节启动子(例如,大鼠糖皮质激素受体启动子系统、人雌激素受体启动子系统、类维生素A启动子系统、甲状腺启动子系统、脱皮激素启动子系统、米非司酮启动子系统等)、金属调节启动子(例如,金属硫蛋白启动子系统等)、发病机理相关调节启动子(例如,水杨酸调节启动子、乙烯调节启动子、苯并噻二唑调节启动子等)、温度调节启动子(例如,热休克诱导型启动子(例如,HSP-70、HSP-90、大豆热休克启动子等)、光调节启动子、合成诱导型启动子等。

[0380] 在一些情况下,通过诱导系统的诱导,含有合适的启动子的基因座或构建体或转基因不可逆地开关。用于诱导不可逆开关的合适的系统是本领域中已知的,例如,可使用Cre-lox介导的重组(参见,例如Fuhrmann-Benzakein等,PNAS(2000)28:e99,其公开内容通过引用并入本文)进行不可逆开关。本领域中已知的重组酶、内切酶、连接酶、重组位点等的任何合适的组合均可用于产生可不可逆地开关的启动子(irreversibly switched promoter)。用于进行本文别处描述的位点特异性重组的方法、机制和需求可用于产生可不可逆地开关的启动子,并且是本领域中周知的,参见例如Grindley等.(2006) Annual Review of Biochemistry, 567-605和Tropp(2012) Molecular Biology (Jones&Bartlett Publishers, Sudbury, MA), 其公开内容通过引用并入本文。

[0381] 在一些情况下,启动子是CD8细胞特异性启动子、CD4细胞特异性启动子、中性粒细胞特异性启动子或NK特异性启动子。例如,可使用CD4基因启动子,参见,例如Salmon等.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7739;和Marodon等.(2003) Blood 101:3416。又例如,可使用CD8基因启动子。通过使用Ncr1(p46)启动子,可实现NK细胞特异性表达,参见例如Eckelhart等.(2011) Blood 117:1565。

[0382] 在一些实施方案中,例如,对于酵母细胞中的表达,合适的启动子是组成型启动

子,例如ADH1启动子、PGK1启动子、ENO启动子、PYK1启动子等,或可调节启动子,例如GAL1启动子、GAL10启动子、ADH2启动子、PHO5启动子、CUP1启动子、GAL7启动子、MET25启动子、MET3启动子、CYC1启动子、HIS3启动子、ADH1启动子、PGK启动子、GAPDH启动子、ADC1启动子、TRP1启动子、URA3启动子、LEU2启动子、ENO启动子、TP1启动子和AOX1(例如,用于毕赤酵母属)。合适的载体和启动子的选择在本领域技术人员的水平之内。

[0383] 用于原核宿主细胞的合适的启动子包括但不限于:噬菌体T7RNA聚合酶启动子;lac操纵子启动子;杂合启动子,例如lac/tac杂合启动子、tac/trc杂合启动子、trp/lac启动子、T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子等;araBAD启动子;体内调节启动子,例如ssaG启动子或相关启动子(例如,参见美国专利公开号20040131637)、pagC启动子(Pulkkinen和Miller, *J. Bacteriol.*, 1991:173 (1):86-93;Alpuche-Aranda等, *PNAS*, 1992;89 (21):10079-83)、nirB启动子(Harborne等. (1992) *Mol. Micro.* 6:2805-2813)等(参见,例如Dunstan等. (1999) *Infect. Immun.* 67:5133-5141;McKelvie等. (2004) *Vaccine* 22:3243-3255;以及Chatfield等(1992) *Biotechnol.* 10:888-892); σ 70启动子,例如一致的 σ 70启动子(参见,例如基因库登录号AX798980、AX798961和AX798183);稳定期启动子,例如dps启动子、spv启动子等;来源于毒力岛SPI-2的启动子(参见,例如W096/17951);actA启动子(参见,例如Shetron-Rama等. (2002) *Infect. Immun.* 70:1087-1096);rpsM启动子(参见,例如Valdivia和Falkow(1996) *Mol. Microbiol.* 22:367);tet启动子(参见,例如Hillen, W.和Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (编辑), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, 第10卷, 第143-162页);SP6启动子(参见,例如Melton等. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7035)等。用于原核生物如大肠杆菌的强启动子包括蛋白限于Trc、Tac、T5、T7和 P_{λ} 。用于细菌宿主细胞的操纵子的非限制性实例包括乳糖启动子操纵子(当与乳糖接触时, LacI阻遏蛋白构象改变,从而阻止LacI阻遏蛋白与操纵子结合)、色氨酸启动子操纵子(当与色氨酸复合时, TrpR阻遏蛋白具有与操纵子结合的构象;在不存在色氨酸的情况下, TrpR阻遏蛋白具有不与操纵子结合的构象)和tac启动子操纵子(参见,例如de Boer等. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25)。

[0384] 编码对象CAR的核苷酸序列可存在于表达载体和/或克隆载体中。当对象CAR包含两个独立的多肽时,编码这两个多肽的核苷酸序列可以克隆在同一载体中或独立的载体中。表达载体可包含选择标记、复制起点和提供用于载体的复制和/或保持的其他元件。合适的表达载体包括例如质粒载体、病毒载体等。

[0385] 大量合适的载体和启动子是本领域技术人员已知的,许多市售用于产生本发明重组构建体。以举例的方式提供了以下载体。细菌:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540和pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。真核生物:pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL (Pharmacia)。

[0386] 表达载体通常具有在启动子附件的方便的限制位点,以提供编码外源蛋白的核酸序列的插入。可存在在表达宿主中有效地选择标记。合适的表达载体包括但不限于病毒载体(例如,基于以下病毒的病毒载体:痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒(参见,例如Li等., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2543-2549, 1994;Borras等, *Gene Ther* 6:515-524,

1999;Li和Davidson,PNAS 92:7700 7704,1995;Sakamoto等,H Gene Ther 5:1088 1097,1999;WO 94/12649,WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655);腺相关病毒(参见,例如Ali等,Hum Gene Ther 9:81 86,1998,Flannery等,PNAS 94:6916 6921,1997;Bennett等,Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863,1997;Jomary等,Gene Ther 4:683690,1997,Rolling等,Hum Gene Ther 10:641 648,1999;Ali等,Hum Mol Genet 5:591 594,1996;Srivastava in WO 93/09239,Samulski等,J.Vir. (1989) 63:3822-3828;Mendelson等,Virol. (1988) 166:154-165;以及Flotte等,PNAS (1993) 90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人类免疫缺陷病毒(参见,例如Miyoshi等,PNAS 94:10319 23,1997;Takahashi等,J Virol 73:7812 7816,1999);逆转录病毒载体(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒,以及来源于你逆转录病毒如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、鸟类白血病病毒、人类免疫缺陷病毒、骨髓增殖肉瘤病毒和乳房肿瘤病毒)等。

[0387] 如上所述,在一些实施方案中,包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽和/或第二多肽的核苷酸序列的核酸在一些实施方案中是RNA,例如,体外合成的RNA。用于体外合成RNA的方法是本领域中已知的,任何方法均可用于合成包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽和/或第二多肽的核苷酸序列的RNA。用于将RNA引入到宿主细胞中的方法是本领域中周知的。参见,例如,Zhao等(2010)Cancer Res.15:9053。可在体外或离体或体内将包含本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽和/或第二多肽的核苷酸序列的RNA引入到宿主细胞中。例如,可在体外或离体用包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的第一多肽和/或第二多肽的核苷酸序列的RNA对宿主细胞(例如,NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞等)进行电穿孔。

[0388] 细胞

[0389] 本公开提供了被遗传修饰以产生本公开的异二聚体条件激活CAR的哺乳动物细胞。

[0390] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和无限增殖化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类动物骨细胞系、啮齿类动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如,美国典型培养物保藏中心(ATCC)号CCL-2)、CHO细胞(例如,ATCC号CRL9618、CCL61、CRL9096)、293细胞(例如,ATCC号CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如,ATCC号CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC号CCL10)、PC12细胞(ATCC号CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC号CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC号CCLI.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCC号CRL1573)、HLHepG2细胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK细胞系(例如,NKL、NK92和YTS)等。

[0391] 在一些情况下,细胞不是无限增殖化细胞系,而是由个体获得的细胞(例如原代细胞)。例如,在一些情况下,细胞是由个体获得的免疫细胞。例如,细胞是由个体获得的T淋巴细胞。又例如,细胞是由个体获得的细胞毒性细胞。又例如,细胞是由个体获得的干细胞或祖细胞。

[0392] 激活免疫细胞的方法

[0393] 本公开提供了激活体外、体内或离体的免疫细胞的方法。该方法通常包括使免疫细胞(体外、体内或离体)与二聚化剂和抗原接触,其中免疫细胞通常被遗传修饰以产生本公开的异二聚体条件激活CAR。在二聚化剂和抗原的存在下,异二聚体条件激活CAR二聚化并且激活免疫细胞,从而产生激活的免疫细胞。免疫细胞包括例如细胞毒性T淋巴细胞、NK

细胞、CD4⁺T细胞、T调节(Treg)细胞等。

[0394] 经遗传修饰的免疫细胞(例如,T淋巴细胞、NK细胞)与二聚化剂和特异性结合对的第二成员(例如,抗原、配体、受体)的接触可使免疫细胞的细胞因子产量与不存在特异性结合对的第二成员和/或二聚化剂的情况下免疫细胞产生的细胞因子的量相比增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。产量增加的细胞因子包括但不限于IL-2和IFN- γ 。

[0395] 经遗传修饰的免疫细胞(例如,T淋巴细胞、NK细胞)与二聚化剂和抗原的接触可使免疫细胞的细胞因子产量与不存在抗原和/或二聚化剂的情况下免疫细胞产生的细胞因子的量相比增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。产量增加的细胞因子包括但不限于IL-2和IFN- γ 。

[0396] 经遗传修饰的细胞毒性细胞(例如,细胞毒性T细胞)与二聚化剂和特异性结合对的第二成员(例如,抗原、配体、受体)的接触可使细胞毒性细胞的细胞毒活性与不存在二聚化剂的情况下细胞毒性细胞的细胞毒活性相比增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。

[0397] 经遗传修饰的细胞毒性细胞(例如,细胞毒性T细胞)与二聚化剂和抗原的接触可使细胞毒性细胞的细胞毒活性与不存在二聚化剂的情况下细胞毒性细胞的细胞毒活性相比增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。

[0398] 在一些实施方案中,例如,根据宿主免疫细胞,经遗传修饰的宿主细胞与二聚化剂和抗原的接触可提高或降低细胞增殖、细胞存活、细胞死亡等。

[0399] 产生可条件性激活的细胞的方法

[0400] 本发明提供了产生可条件性激活的细胞的方法。该方法通常包括用包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列的表达载体或RNA(例如,体外转录的RNA)对哺乳动物细胞进行遗传修饰。遗传修饰细胞在a)与CAR的第一多肽结合的抗原和b)二聚化剂的存在下可条件性激活。遗传修饰可以在体内、体外或离体急性。细胞可以是免疫细胞(例如,T淋巴细胞或NK细胞)、干细胞、祖细胞等。

[0401] 在一些情况下,离体进行遗传修饰。例如,由个体获得T淋巴细胞、干细胞或NK细胞,对由个体获得的细胞进行遗传修饰以表达本公开的CAR。遗传修饰细胞在a)与CAR的第一多肽结合的抗原和b)二聚化剂的存在下可条件性激活。在一些情况下,离体激活经遗传修饰的细胞。在另一些情况下,将经遗传修饰的细胞引入到个体(例如,获得细胞的个体);以及在体内激活遗传修饰细胞,例如,通过向个体施用二聚化剂实现,例如,当抗原存在于个体的细胞表面上时,不需要施用抗原。经遗传修饰的细胞与存在于个体的细胞表面上的抗原接触;以及在向个体施用二聚化剂后,激活经遗传修饰的细胞。例如,当经遗传修饰的细胞是T淋巴细胞时,经遗传修饰的细胞可对表面上存在与CAR结合的抗原的细胞表现出细胞毒性。

[0402] 治疗方法

[0403] 本公开提供了施用本发明CAR的多种治疗方法。

[0404] 细胞毒性方法

[0405] 本公开的CAR当存在于T淋巴细胞或NK细胞中时,可介导对靶细胞的细胞毒性。本公开的CAR与靶细胞上存在的抗原结合,从而介导经遗传修饰以产生CAR的T淋巴细胞或NK细胞对靶细胞的杀伤。CAR的抗原结合结构域与靶细胞表面上存在的抗原结合。

[0406] 靶细胞包括但不限于癌细胞。因此,本公开提供了杀伤靶细胞或抑制靶细胞的生长的方法,该方法包括接触经遗传修饰以产生本发明CAR的细胞毒性免疫效应细胞(例如,细胞毒性T细胞、NK细胞),从而使T淋巴细胞或NK细胞识别存在于靶细胞表面上的抗原,并且介导对靶细胞的杀伤。

[0407] 本公开提供了治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括:i)用包含编码本公开的异二聚体条件激活CAR的核苷酸序列的表达载体对获自个体的T淋巴细胞进行免疫修饰,其中异二聚体条件激活CAR的抗原结合结构域对个体癌细胞上的表位具有特异性,并且其中遗传修饰离体进行;ii)将经遗传修饰的T淋巴细胞引入到个体中;以及iii)向个体施用有效量的二聚化剂,其中二聚化剂诱导异二聚体条件激活CAR的二聚化,其中所述二聚化提供经遗传修饰的T细胞的激活以及对癌细胞的杀伤,从而治疗癌症。

[0408] 可通过本文公开的方法治疗的癌包括但不限于食管癌、肝细胞癌、基底细胞癌(皮肤癌的一种形式)、鳞状细胞癌(各种组织)、膀胱癌(包括移行细胞癌(膀胱的恶性新生物))、支气管癌结肠癌、结直肠癌、胃癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、囊腺癌、髓样癌、肾细胞癌、原位管癌或胆道癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎癌、Wilm氏瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、成骨癌(osteogenic carcinoma)、上皮癌和鼻咽癌。

[0409] 可通过本文公开的方法治疗的肉瘤包括但不限于纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、成骨肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤和其他软组织肉瘤。

[0410] 其他可通过本文公开的方法治疗的实体瘤包括但不限于神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0411] 可通过本文公开的方法治疗的白血病包括但不限于:a)慢性骨髓增生综合征(多潜能造血干细胞的肿瘤性疾病);b)急性骨性白血病(多潜能造血干细胞或限制性谱系潜能的造血细胞的肿瘤性转化);c)慢性淋巴细胞白血病(CLL;免疫不成熟继和功能不全的小淋巴细胞的克隆增殖),包括B细胞CLL、T细胞CLL前淋巴细胞性白血病和毛细胞白血病;以及d)急性淋巴性白血病(以原淋巴细胞积累为特征)。可使用本发明方法治疗的淋巴瘤包括但不限于B细胞淋巴瘤(例如,伯基特氏淋巴瘤)、霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤等。

[0412] 其他可根据本文公开的方法治疗的癌症包括非典型性脑膜瘤(脑)、胰岛细胞癌(胰脏)、髓样癌(甲状腺)、间叶瘤(肠)、肝细胞癌(肝)、肝胚细胞癌(肝)、透明细胞癌(肾)和神经纤维瘤纵膈。

[0413] 免疫调节方法

[0414] 本发明方法还可用于治疗炎症病症和自身免疫病。使本发明CAR在T辅助细胞或Tregs中表达以用于免疫调节方法。免疫调节方法包括例如增强哺乳动物对象中对病原体

的免疫应答；增强免疫功能低下对象中的免疫应答；降低炎性反应；境地哺乳动物对象中对自身抗原的免疫应答，例如以治疗自身免疫病；以及降低经受移植器官或组织的对象中的免疫应答，以减少器官或组织排斥。

[0415] 当方法涉及降低对自身抗原的免疫应答时，用于激活CAR的抗原是自身抗原。当方法涉及降低对移植的器官或组织的免疫应答时，用于激活CAR的抗原是移植器官特异性抗原。

[0416] 剂型、剂量和施用途径

[0417] 如上文讨论的，本公开的治疗方法包括向有此需要的个体施用有效量的二聚化剂，并且还可以包括施用抗原。

[0418] 在一些情况下，二聚化剂的“有效量”是指以下量：与不存在二聚化剂的情况下T淋巴细胞的细胞毒活性相比，当以一个或多个剂量向有此需要的个体施用使表达本发明CAR的T淋巴细胞的细胞毒活性水平提高至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。

[0419] 在一些情况下，二聚化剂的“有效量”是指以下量：与不存在二聚化剂的情况下NK细胞的细胞毒活性相比，当以一个或多个剂量向有此需要的个体施用使表达本发明CAR的NK细胞的细胞毒活性水平提高至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍或超过10倍。

[0420] 在一些情况下，二聚化剂的“有效量”是指以下量：与不存在二聚化剂的情况下的癌细胞数和/或肿瘤质量相比，当以一个或多个剂量向有此需要的个体施用使个体中的癌细胞数和/或个体中的肿瘤治疗降低至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约75%或超过75%。

[0421] 在一些情况下，二聚化剂的有效量是以下量：与不存在二聚化剂的情况下的肿瘤生长速率、癌细胞数或肿瘤质量相比，当以一个或多个剂量单独施用(例如，在单药物治疗中)或与一种或多种额外治疗剂组合施用(例如，在联合治疗中)时，有效地使肿瘤生长速率、癌细胞数和肿瘤质量中的一种或多种降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多。

[0422] 制剂

[0423] 在本发明方法中，可使用任何能够导致期望的治疗效果或诊断效果的常规方法向宿主施用二聚化剂。因此，可将二聚化剂并入到多种用于治疗性施用的剂型中。更特别地，可将二聚化剂通过与合适的药学可接受载剂或稀释剂组合来配置成药物组合物，并且可配置成固体、半固体、液体或气体形式，例如片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。

[0424] 在药物剂型中，可以其药学可接受盐的形式施用二聚化剂，或其可以单独施用或与其他药学活性化学适当缔合或组合。以下方法和赋形剂仅是示例性的，而决不是限制。

[0425] 合适的赋形剂载剂是例如水、盐、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。此外，若需要，载剂可以包含少量辅助物质，例如润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。制备这样的剂型的实际方法

是本领域技术人员已知的或可以理解的。参见例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 第17版, 1985。在任何情况下, 待施用的组合物或剂型可包含适合于在被治疗对象中取得期望状态的量的二聚化剂。

[0426] 药学可接受赋形剂如载剂、佐剂、载体或稀释剂对于公众是现成的。另外, 药学可接受辅助物质如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、润湿剂等对于公众是现成的。

[0427] 对于口服制剂, 二聚化剂可单独使用或与合适的添加剂组合一制备片剂、散剂、颗粒剂或胶囊剂, 例如, 与常规添加剂, 例如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉; 与粘合剂, 例如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶; 与崩解剂, 例如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠; 与润滑剂, 例如滑石或硬脂酸镁; 以及如需要, 与稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂和芳香剂。

[0428] 可通过将二聚化剂溶解、混悬或乳化在溶剂中来将其制备成注射用制剂, 该溶剂例如植物油及其他类似油、合成脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸或丙二醇的酯; 以及如需要, 具有常规添加剂, 例如增溶剂、等渗剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

[0429] 通过将具有期望纯度的二聚化剂与任选的药学可接受载体、赋形剂、稳定剂、表面活性剂、缓冲剂和/或张度剂混合来制备含有二聚化剂的药物组合物。可接受载体、赋形剂和/或稳定剂在使用剂量和浓度下对接受者无毒, 并且包括: 缓冲剂, 例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、甲硫氨酸和柠檬酸; 防腐剂 (例如, 乙醇、苯甲醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵或其组合); 氨基酸, 例如精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸及其组合; 单糖、二糖及其他碳水化合物; 低分子量 (小于约10个残基) 多肽; 蛋白质, 例如明胶或血清白蛋白; 螯合剂, 例如EDTA; 糖, 例如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡萄糖胺、N-甲基葡萄糖胺、半乳糖胺和神经氨酸; 和/或非离子表面活性剂, 例如Tween、Brij Pluronics、Triton-X或聚乙二醇 (PEG)。

[0430] 药物组合物可以是液体形式、冻干形式或由冻干形式重构的液体形式, 其中在施用前将冻干制剂与无菌溶液重构。用于重构冻干组合物的标准程序是将其添加回一定体积的纯水 (通常等于冻干过程中移除的体积), 但是, 含有抗菌剂的溶液也可用于产生用于胃肠外施用的药物组合, 另外参见Chen (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54。

[0431] 本文使用的术语“单位剂量形式”实质适合作为单剂量用于人和动物对象的物理离散单位, 每单位包含以足以产生期望效果的量计算的预定量的二聚化剂, 以及药学可接受稀释剂、载体或载剂。规定二聚化剂的规格可取决于所使用的特地二聚化剂和待实现的效果, 以及宿主中与每一种二聚化剂相关的药效动力性。

[0432] 在一些实施方案中, 二聚化剂被配置成控释制剂。以使用本领域中周知的方法制备控释制剂。控释制剂的合适的实例包括含有二聚化剂的固体疏水聚合物的半渗透基质, 其中基质为成型制品的形式, 例如膜或微胶囊。控释基质的实例包括聚酯、L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯醋酸乙烯酯、水凝胶、聚乳酸、可降解乳酸乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。通过使用合适的添加剂, 控制含水量和形成特定的聚合物基质组合物, 可放置生物活性的可能的损失。

[0433] 剂量

[0434] 合适的剂量可由主治医生或其他有资质的医务人员根据多种临床因素来确定。如医学领域中周知的,用于任何一个患者的剂量取决于多种因素,包括患者的体型大小、身体表面积、年龄,待施用的特定二聚化剂、患者的年龄,施用时间和途径、总体健康状况和同时施用的其他药物。可以以下量施用二聚化剂:1ng/kg体重至20mg/kg体重每剂,例如,0.1mg/kg体重至10mg/kg体重,例如0.5mg/kg体重至5mg/kg体重,但是,预期了低于或高于该示例性范围的剂量。如果方案为连续输注,也可以为1 μ g至10mg/kg体重每分钟。

[0435] 本领域技术人员容易理解,剂量水平可根据特定二聚化剂、症状的严重程度和对象对副作用的敏感性而变化。本领域技术人员通过多种手段可容易地确定给定化合物的优选剂量。

[0436] 施用途径

[0437] 使用任何适合药物递送的可用方法和途径来施用二聚化剂,包括体内和离体方法,以及系统的和局部的施用途径。

[0438] 常规的药学可接受施用途径包括瘤内、瘤旁、肌内、气管内、颅内、皮下、真皮内、局部施用、静脉内、动脉内、经直肠、鼻、口和其他长的和肠胃外途径施用。如需要,施用途径可以组合,或根据二聚化剂和/或期望效果进行调整。可以单剂量或多剂量施用二聚化剂。在一些实施方案中,口服施用二聚化剂。在一些实施方案中,通过吸入途径施用二聚化剂。在一些实施方案中,鼻内施用二聚化剂。在一些实施方案中,局部施用二聚化剂。在一些实施方案中,瘤内施用二聚化剂。在一些实施方案中,瘤旁施用二聚化剂。在一些实施方案中,颅内施用二聚化剂。在一些实施方案中,静脉内施用二聚化剂。

[0439] 可使用任何适合递送常规药物的可用的常规方法和途径(包括系统性途径和局部性途径)向宿主施用药剂。一般来说,本发明预期的施用途径包括但未必限于肠、肠胃外或吸入途径。

[0440] 除了吸入施用外的肠胃外施用途径包括但未必限于:局部、经皮、皮下、肌内、眼眶内、囊内、椎管内、胸骨内、瘤内、瘤旁和静脉内途径,即,除了通过消化道以外的任何施用途径。可进行胃肠外施用以有效地系统性或局部性递送二聚化剂。当期望系统性递送时,施用通常涉及药物制剂的侵入性或系统性吸收的局部或粘膜施用。

[0441] 还可通过肠施用向对象递送二聚化剂。肠施用途径包括但未必限于口服递送和直肠(例如,施用栓剂)递送。

[0442] 治疗抑制至少改善影响宿主的病理状态相关的症状,其中改善被广义使用,是指至少减少待治疗病理状态(例如癌症)相关的参数(例如,症状)的量级。这样,治疗还包括以下情况,其中病理状态或至少其相关症状被完全抑制,例如阻止发生或终止(例如,结束),使得宿主不再遭受病理状态或至少以所述病例状态为特征的症状。

[0443] 在一些实施方案中,通过注射和/或递送到例如脑动脉的部位或直接到脑组织中来施用二聚化剂。可以将二聚化剂直接施用到靶部位,例如,通过注射、通过药物递送装置如渗透泵缓释颗粒的植入、通过biolistic递送到靶部位等。

[0444] 联合疗法

[0445] 在一些实施方案中,施用二聚化剂来作为标准癌症疗法的辅助疗法。标准癌症疗法包括外科手术(例如,手术除去癌组织)、放射疗法、骨髓移植、化学疗法治疗、抗体治疗、生物反应调节剂治疗以及前述疗法的某些组合。

[0446] 放射疗法包括但不限于由外部应用的来源如光束或小放射源的植入释放的x射线或 γ 射线。

[0447] 用于癌症治疗的合适的抗体包括但不限于：裸抗体，例如曲妥单抗(赫赛汀)、贝伐单抗(AvastinTM)、西妥昔单抗(ErbixTM)、帕尼单抗(VectibixTM)、伊匹单抗(YervoyTM)、利妥昔单抗(Rituxan)、阿伦单抗(LemtradaTM)、奥法木单抗(ArzerraTM)、奥法伏单抗(OvaRexTM)、Lambrolizumab(MK-3475)、帕妥珠单抗(PerjetaTM)、兰尼单抗(LucentisTM)等，以及缀合的抗体，例如帕妥单抗(MylortargTM)、Brentuximab vedotin(AdcetrisTM)、⁹⁰Y-标记的替依莫单抗(ZevalinTM)、¹³¹I-标记的tositumoma(BexxarTM)等。用于治疗癌症的合适的抗体包括但不限于针对肿瘤相关抗原的抗体。这样的抗原包括但不限于：CD20、CD30、CD33、CD52、EpCAM、CEA、gpA33、Mucins、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、神经节苷脂(例如，GD2、GD3、GM2等)、Le^y、VEGF、VEGFR、整合素 α -V- β -3、整合素 α -5- β -1、EGFR、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、腱生蛋白等。

[0448] 适合结合本公开的方法使用的生物反应调节剂包括但不限于：(1)酪氨酸激酶(RTK)活性抑制剂；(2)丝氨酸/苏氨酸激酶活性抑制剂；(3)肿瘤相关抗原拮抗剂，例如与肿瘤抗原特异性结合的抗体；(4)凋亡受体拮抗剂；(5)白介素-2；(6)白介素- α ；(7)白介素- γ ；(8)集落刺激因子；(9)血管生成的抑制剂；以及(10)肿瘤坏死因子的拮抗剂。

[0449] 化学治疗剂是降低癌细胞的增殖的非肽(即，非蛋白质)化合物，包括细胞毒性剂和细胞静止素。化学治疗剂的非限制性实例包括烷化剂、亚硝基脲、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、植物(长春花)生物碱和类固醇激素。

[0450] 用于降低细胞增殖的药剂时本领域中已知并且广泛使用的。这样的药剂包括烷化剂，例如氮芥、亚硝基脲、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐和三氮烯，包括但不限于二氯甲基二乙胺、环磷酰胺(CytosanTM)、美法仑(L-sarcosylsin)、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、司莫司汀(甲基-CCNU)、链脲霉素、氯脲霉素、尿嘧啶氮芥、氮芥(chlormethine)、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、哌啶溴烷、三乙撑蜜胺、三乙撑硫代磷胺、白消安、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0451] 抗代谢物包括包括叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂，包括但不限于阿糖胞苷(CYTOSAR-U)、胞嘧啶阿糖胞苷、氟尿嘧啶(5-FU)、福尿苷(FudR)、6-巯鸟嘌呤、6-巯基嘌呤(6-MP)、喷司他丁、5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲氨蝶呤、10-炔丙基-5,8-二脱氮叶酸(PDDF/CB3717)、5,8-二四氢叶酸(DDATHF)、甲酰四氢叶酸、氟达拉滨磷酸盐、喷司他丁和吉西他滨。

[0452] 合适的天然产物及其衍生物(例如，长春花生物碱、抗肿瘤抗生素、酶、淋巴因子和表鬼臼毒素)包括但不限于Ara-C、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、脱氧助间型霉素、丝裂霉-C、左旋门冬酰胺酶、硫唑嘌呤；布喹那；生物碱，例如长春新碱、硫酸长春碱、长春瑞滨、长春地辛等；鬼臼毒素，例如依托泊苷、替尼泊苷等；抗生素，例如蒽环类药物、道诺霉素盐酸盐(道诺霉素、比红霉素、柔红霉素)、伊达比星、多柔比星、表柔比星和吗啉代衍生物等；phenoxizone二环肽，例如更生霉素；碱性糖肽，例如博来霉素；蒽醌苷，例如普卡霉素(光神霉素)；蒽二酮，例如米托蒽醌；azirinopyrrolo indolediones，例如丝裂霉素；大环免疫抑制剂，例如，环孢霉素、FK-506(他克莫司prograf)、雷帕霉素等；等。

[0453] 其他抗增殖细胞毒素剂是navelbene、CPT-11、阿那曲唑、来曲唑、卡培他滨、reloxafine、环磷酰胺、ifosamide和droloxafine。

[0454] 具有抗增殖活性的微管作用剂也适合使用,并且包括但不限于秋水仙碱(NSC 406042)、软海绵素B(NSC 609395)、秋水仙碱(NSC757)、秋水仙碱衍生物(例如,NSC 33410)、dolstatin 10(NSC376128)、美登素(NSC 153858)、根霉素(NSC 332598)、紫杉醇(Taxol®)、Taxol®衍生物、多西他赛(Taxotere®)、硫代秋水仙碱(NSC 361792)、三苯甲基cysterin、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、天然的和合成的埃博霉素,包括但不限于埃博霉素A、埃博霉素B、海绵内酯;雌莫司汀、诺考达唑等。

[0455] 适合使用的激素调节剂和类固醇(包括合成类似物)把包括但不限于肾上腺皮质类固醇,例如强的松、地塞米松等;雌激素和孕酮,例如己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雌二醇、克罗米芬、三苯氧胺等;以及肾上腺皮质抑制剂,例如氨鲁米特;17 α -乙炔雌二醇;二乙基己烯雌、睾酮、氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、甲基强的松龙、甲基-睾酮、强的松龙、去炎松、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺(Drogenil)、托瑞米芬(Fareston)和Zoladex®。雌激素刺激增殖和分化,因此使用与雌激素受体结合的化合物来阻断该活性。皮质类固醇可抑制T细胞增殖。

[0456] 其他化学治疗剂包括金属配合物,例如顺铂(cis-DDP)、卡铂等;脲类,例如羟基脲;以及胍,例如N-甲基胍;表鬼臼毒素;拓扑异构酶抑制剂;甲基苄胍;米托蒽醌;甲酰四氢叶酸;替加氟等。请他感兴趣的抗增殖剂包括免疫抑制剂,例如霉酚酸、沙利度胺、脱氧司加林(desoxyspergualin)、Azasporine、来氟米特、咪唑立宾、azaspirane(SKF 105685);Iressa®(ZD 1839,4-(3-氯-4-氟苯基氨基)-7-甲氧基-6-(3-(4-吗啉基)丙氧基)喹唑啉)等。

[0457] “紫杉烷”包括紫杉醇和任何活性的紫杉烷衍生物或前药。“紫杉醇”(其在本文中可理解为包括类似物、制剂和衍生物,例如多西他赛、TAXOL™、TAXOTERE™(一种多西他赛的制剂)、紫杉醇的10-去乙酰基类似物和紫杉醇的3'-N-去苯甲酰基-3'-N-叔丁氧基糖基类似物)可利用本领域技术人员已知的技术(还参见WO 94/07882、WO 94/07881、WO 94/07880、WO 94/07876、WO 93/23555、WO 93/10076;美国专利号5,294,637;5,283,253;5,279,949;5,274,137;5,202,448;5,200,534;5,229,529;和EP 590,267)很容易地制备,或者有多种商业来源获得,包括例如Sigma Chemical Co.,St.Louis,Mo.(T7402-来自短叶紫杉(Taxus brevifolia);or T-1912-来自Taxus yunnanensis)。

[0458] 紫杉醇应理解为不仅是指常见的市售形式的紫杉醇,还包括类似物和衍生物(例如,上述Taxotere™多西他赛)和紫杉醇缀合物(例如,紫杉醇-PEG、紫杉醇-右旋糖酐或紫杉醇-木糖)。

[0459] 术语“紫杉烷”还包括各种已知的衍生物,包括亲水性衍生物和疏水性衍生物。紫杉烷衍生物但不限于国际专利申请号WO 99/18113中描述的半乳糖和甘露糖衍生物;WO 99/14209中描述的哌嗪(piperazino)和其他衍生物;WO 99/09021、WO 98/22451和美国专利号5,869,680中描述的紫杉烷衍生物;WO 98/28288中描述的6-硫代衍生物;美国专利号5,821,263中描述的亚磺酰胺衍生物;以及美国专利申请号5,415,869中描述的紫杉醇衍生物。还包括紫杉醇的前药,包括但不限于WO 98/58927、WO 98/13059和美国专利号5,824,701中描述的那些。

[0460] 适合治疗的对象

[0461] 多种对象均适合于本发明治疗癌症的方法。合适的对象包括患有癌症、被诊断患有癌症、具有出现癌症的风险、曾患有癌症并且具有癌症复发风险、已经用二聚化剂以外的药剂治疗癌症但是对于这样的治疗没有响应、或者已经用二聚化剂以外的药剂治疗癌症但是初始对在这样的治疗响应后复发的任何个体，例如人或非人动物。

[0462] 合适利用本发明免疫调节方法治疗的对象包括患有自身免疫病的个体；作为器官或组织抑制受体等的个体；免疫功能低下的个体；以及被病原体感染的个体。

实施例

[0463] 给出了以下实施例来向本领域技术人员提供对如何制备和使用本发明的完整的公开和描述，而不是旨在限制发明人认为的本发明的范围，也不是旨在表示以下的实验是全部或仅进行的实验。尽管已经努力确保所使用数值（例如，量、温度等）的精准度，但是一些实验误差和偏差也应考虑。除非另有说明，否则分数为重量分数，分子量为数均分子量，温度为摄氏度，压力为大气压或接近大气压。可能使用标准缩写，例如，bp，碱基对；kb，千碱基；pl，皮升；s或sec，秒；min，分钟；h或hr，小时；aa，氨基酸；kb，千碱基；bp，碱基对；nt，核苷酸；i.m.，肌内；i.p.，腹膜内；s.c.，皮下；i.v.，静脉内；等等。

[0464] 实施例1:CAR的产生

[0465] 材料和方法

[0466] 在整个设计优化过程中，选择抗人CD19scFv作为CAR中的抗原识别结构域。图18A和图18B总结了由两个数值所标识多肽组成的每一个CAR的分子结构。所有膜固定多肽是二硫化物结合的同二聚体。为了图示简洁，膜结合多肽以单体示出。

[0467] CAR构建体的产生

[0468] 由构建体克隆编码数字识别序列。由Open Biosystems提供的cDNA克隆人4-1BB共刺激和CD3ζITAM信号链。由Addgene提供的质粒克隆FKBP和FRB编码序列。

[0469] 使用标准分子克隆技术（聚合酶链式反应（PCR）、限制性消化、连接等）产生慢病毒表达质粒。

[0470] 效应细胞和靶细胞培养条件

[0471] 如由大学机构审查委员会（University Institutional Review Board）批准的，在单采血液成分术（Trima residuals from Blood Centers of the Pacific, San Francisco, CA）后，使用RosetteSep Human CD8+T Cell Enrichment Cocktail（STEMCELL Technologies#15063）通过阴性选择由匿名捐献者分离人原代CD8+T细胞。将细胞培养在由X-VIV015（Lonza#04-418Q）、5%人AB血清（Valley Biomedical Inc., #HP1022）、10mM N-乙酰基L-半胱氨酸（Sigma-Aldrich#A9165）和100IU/mL重组人IL-2（NCI/BRB Preclinical Repository）构成的人T细胞培养基中。在用NFAT激活后，将表达绿叶荧光蛋白（GFP）的Jurkat细胞系培养在补充有10%胎牛血清（FBS）、青霉素和链霉素的RPMI-1640培养基中。来自U.Penn的K562靶细胞培养在补充有10%FBS的IMDM中。

[0472] 利用慢病毒改造效应细胞和靶细胞

[0473] 由使用脂质体LTX（Life Technologies#15338）共转染有pHR' SIN:CSW转基因表达载体、病毒包装质粒pCMVdR8.91和pMD2.G的Lenti-X 293T细胞（Clontech Laboratories#632180）产生泛热带分布的VSV-G假病毒型慢病毒。在转染48小时后收集感染培养基上清液

并且直接用于转导。

[0474] 在病毒转导前24小时,使用人T细胞激活剂CD3/CD28Dynabeads (Life Technologies#111-31D)以1:3的细胞:珠比例激活原代人T细胞。使Jurkat和K562细胞预先分裂1~2天以确保在转导时培养物为对数生长期。在进行试验前将转导的Jurkat和K562细胞培养至少7天。将原代T细胞以约 10^6 /mL保持在人T细胞培养基中至少2周,直到细胞恢复静息状态。通过使用流式细胞仪检测荧光图缀合抗体或荧光报告蛋白来量化慢病毒构建体编码的CAR的表达水平。

[0475] IL-2产量和NFAT活性的量化

[0476] 将表达CAR的Jurkat CD4+T细胞与来自U.Penn的同源或非同源的K562靶细胞以1:2效应细胞:靶细胞的比例混合。将雷帕霉素类A/C异二聚化剂(Clontech Laboratories#635055)在培养基中连续稀释,并且添加到反应混合物中。孵育20~24小时后,收集培养物上清液并且利用BD OptEIA人IL-2ELISA Set (BD Biosciences#555190)进行分析。进行流式细胞术以量化Jurkat细胞中NFAT依赖性GFP报告蛋白的表达,作为CAR活性的单独指示。

[0477] 基于流式细胞术的重定向的细胞毒性分析

[0478] 对同源和非同源K562靶细胞进行改造,以使得可通过流式细胞术同时量化混合物中的两种细胞类型。将靶细胞以1:1比例混合并且与人原代CD8+效应T细胞以5:2效应细胞:靶细胞的比例共孵育。向反应混合物中添加100IU/mL人IL-2和不同量的雷帕霉素类(Clontech Laboratories#635055)。孵育24小时后,上清液以400g离心5分钟。将沉淀的细胞重悬在洗涤缓冲液(PBS+0.5%BSA+0.1%叠氮化钠)中并且在流式细胞之前用等量BD Cytotfix (BD cat#554655)固定。计算每份样品的同源靶细胞的存活率和非同源靶细胞的存活率的比率,以计算效应细胞的重定向的细胞毒性。

[0479] 结果

[0480] 评估了多种CAR构建体引起的IL-2的产生。数据表示在图12中。

[0481] 图12。由5个开关CAR变体引起的IL-2产生。效应细胞=被改造具有CAR的CD4+Jurkat T细胞。靶细胞=具有或不具有通过CD19抗体的K562细胞系。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)量化效应细胞分泌的IL-2的量。

[0482] 图13。在与图12中所述相同的实验中,对照Jurkat细胞系的IL-2产生。构建体“125”编码目前临床试验中使用的常规控制。

[0483] 图14。在与图12中所述那些相同的条件下的单独实验中,“122+206”和“197+206”之间的比较。

[0484] 图15证明了开关CAR“197+206”赋予的药理上可滴定的细胞毒性。在少量雷帕霉素类的存在下,CAR有效介导对于同源靶细胞的重定向的细胞毒性。在高剂量的雷帕霉素类下,这种开关CAR可发出与“125”的常规CAR一样强的信号。效应细胞=被改造具有CAR的人原代CD8+T细胞。靶细胞=表达同源人CD19抗原或非同源人间皮素抗原的K562细胞系的荧光衍生物。

[0485] 图16描绘了使用来自T细胞受体途径的细胞质酪氨酸激酶Zap70作为胞内信号结构域构建的CAR的数据。

[0486] 图16示出了来自被改造具有多种开关CAR的Jurkat细胞的数据。改造的Jurkat与具有或不具有同源抗原(CD19)的K562靶细胞和所指示浓度的雷帕霉素类共孵育。作为CAR

组分,Zap70激酶(标记“199”的左起第一和第二个构建体)与ITAM(标记“168”的左起第三个构建体)在激活NFAT功能上一样有效。4-1BB信号结构域的调节增加了受体的抗原识别部分的表达,并且导致“197+199”更强的信号。包括无信号CAR(最右)作为阴性对照。

[0487] 实施例2:CAR靶向间皮素

[0488] 材料和方法

[0489] 制备并测试了许多嵌合抗原受体。本文示出的构建体编码三种不同的抗人间皮素scFv作为抗原识别结构域。图19A、19B和19C总结了每一种抗人间皮素CAR的分子结构,其中每一种CAR均包含两个多肽。每个抗人间皮素CAR的细胞间部分均包含两个4-1BB共刺激结构域、FKBP和FRB二聚化剂结合对和ITAM胞内信号结构域。本文示出的三种不同的抗原识别结构域是抗间皮素HN1scFv、SS1scFv和m912scFv。所有膜固定多肽是二硫化物结合的同二聚体。

[0490] CAR构建体的产生

[0491] 由构建体克隆或通过PCR的基因装配合成编码抗间皮素的序列。由Open Biosystems提供的cDNA克隆人4-1BB共刺激和CD3 ζ ITAM信号链。通过PCR合成HN1scFv-、SS1scFv-和m912scFv-编码序列,并且在一些情况下,进行密码子优化。由Addgene质粒克隆FKBP和FRB编码序列。

[0492] 使用标准分子克隆技术(聚合酶链式反应(PCR)、限制性消化、连接等)产生慢病毒表达质粒。

[0493] 效应细胞和靶细胞培养条件

[0494] 在NFAT激活后,将表达GFP的Jurkat细胞系培养在补充有10%FBS、青霉素和链霉素的RPMI-1640培养基中。K562靶细胞培养在补充有10%胎牛血清(FBS)的IMDM中。

[0495] 利用慢病毒改造效应细胞和靶细胞

[0496] 由使用脂质体LTX(Life Technologies#15338)共转染有pHR' SIN:CSW转基因表达载体、病毒包装质粒pCMVdR8.91和pMD2.G的Lenti-X 293T细胞(Clontech Laboratories#632180)产生VSV-G假病毒型慢病毒。在转染48小时后收集感染培养基上清液并且直接用于转导。

[0497] 使Jurkat和K562细胞预先分裂1~2天以确保在转导时培养物为对数生长期。在进行试验前将转导的Jurkat和K562细胞培养至少7天。通过使用流式细胞仪检测荧光缀合抗体或荧光报告蛋白来量化慢病毒构建体编码的CAR的表达水平。

[0498] IL-2产量的量化

[0499] 将表达CAR的Jurkat CD4+T细胞与同源或非同源的K562靶细胞以1:2效应细胞:靶细胞的比例混合。雷帕霉素类A/C Heterodimerizer(Clontech Laboratories#635055)在培养基中连续稀释,并且添加到反应混合物中。孵育20~24小时后,收集培养物上清液并且利用BD OptEIA Human IL-2ELISA Set(BD Biosciences#555190)进行分析。

[0500] 结果

[0501] 评估了由抗间皮素CAR构建体引起的IL-2的产生。数据表示在图19D至图19F中。

[0502] HN1scFv(图19D)、SS1scFv(图19E)和m912scFv(图19F)开关CAR变体引起的IL-2产生。测量并且包括由常规CAR(图19G,构建体#358)产生的IL-2,用于与开关CAR进行比较(图19D)。效应细胞=被改造具有CAR的人CD4+Jurkat T细胞。靶细胞=具有或不具有同源抗原

的K562细胞系。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)量化效应细胞分泌的IL-2的量。

[0503] 实施例3:赤霉酸作为开关CAR的二聚化剂

[0504] 材料和方法

[0505] 图20A总结了本发明赤霉酸二聚化剂CAR的分子结构。抗原结合部分包含抗人CD19scFv。胞内部分包含两个4-1BB共刺激结构域、GID1和GAI二聚化剂结合对和ITAM胞内信号结构域。所有膜固定多肽是二硫化物结合的同二聚体。

[0506] CAR构建体的产生

[0507] 由构建体克隆编码赤霉酸二聚化剂CAR的序列。由质粒克隆抗CD19scFv。由Open Biosystems提供的cDNA克隆人4-1BB共刺激和CD3ζITAM信号链。由Addgene质粒克隆GID1和GAI编码序列。使用标准分子克隆技术(聚合酶链式反应(PCR)、限制性消化、连接等)产生慢病毒表达质粒。

[0508] 效应细胞和靶细胞培养条件

[0509] 在NFAT激活后,将表达GFP的Jurkat细胞系培养在补充有10%FBS、青霉素和链霉素的RPMI-1640培养基中。K562靶细胞培养在补充有10%胎牛血清(FBS)的IMDM中。

[0510] 利用慢病毒改造效应细胞和靶细胞

[0511] 由使用脂质体LTX(Life Technologies#15338)共转染有pHR' SIN:CSW转基因表达载体、病毒包装质粒pCMVdR8.91和pMD2.G的Lenti-X 293T细胞(Clontech Laboratories#632180)产生泛热带分布的VSV-G假病毒型慢病毒。在转染48小时后收集感染培养基上清液并且直接用于转导。

[0512] 使Jurkat和K562细胞预先分裂1~2天以确保在转导时培养物为对数生长期。在进行试验前将转导的Jurkat和K562细胞培养至少7天。通过使用流式细胞仪检测荧光图缀合抗体或荧光报告蛋白来量化慢病毒构建体编码的CAR的表达水平。

[0513] IL-2产量的量化

[0514] 将表达CAR的Jurkat CD4+T细胞与同源或非同源的K562靶细胞以1:2效应细胞:靶细胞的比例混合。在乙醇中预溶解的赤霉酸-3乙酰氧基甲基酯(赤霉酸-3AM)在生长培养基中稀释(Toronto Research Chemicals#G377500),并且添加到反应混合物中。孵育20~24小时后,收集培养物上清液并且利用BD OptEIA人IL-2ELISA Set(BD Biosciences#555190)进行分析。

[0515] 结果

[0516] 评估了由赤霉酸二聚化剂CAR构建体引起的IL-2的产生。数据表示在图20B中。

[0517] 由赤霉酸二聚化剂CAR变体引起的IL-2产生(图20B)。测量并且包括由常规CAR(图20C,构建体“125”)产生的IL-2,用于与开关CAR进行比较。效应细胞=被改造具有CAR的人CD4+Jurkat T细胞。靶细胞=具有或不具有同源间皮素CD19抗原的K562细胞系。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)量化效应细胞分泌的IL-2的量。

[0518] 实施例4:具有多个共刺激结构域的开关CAR

[0519] 材料和方法

[0520] 基本上如实施例1中所述制备若干嵌合抗原受体构建体,只是用多个其他共刺激结构域交换了4-1BB共刺激结构域。图21A和图21B总结了这里描述的CAR的分子结构。

[0521] CAR构建体的产生

[0522] 由质粒克隆编码抗人CD19scFv的序列。由Open Biosystems提供的cDNA克隆人CD3ζITAM信号链和人共刺激结构域CD28和OX-40编码序列。由Addgene质粒克隆FKBP和FRB编码序列。

[0523] 使用标准分子克隆技术(聚合酶链式反应(PCR)、限制性消化、连接等)产生慢病毒表达质粒。

[0524] CAR构建体的测试

[0525] 使用含有开关CAR CD28和OX-40共刺激结构域的构建体(图21A-21B,分别为构建体“365+367”和“399+400”)和相应常规CAR对照(图21C-21D,分别为构建体“366”和“398”),根据实施例1对效应细胞和靶细胞进行培养和转染。还可如实施例1所述使用含有CD28共刺激结构域的构建体和含有OX-40共刺激结构域的构建体进行IL-2产量、NFAT活性测定以及基于流式细胞术的测定。或者,可使含有开关CAR CD28和OX-40共刺激结构域的亚基的构建体与实施例1的构建体的亚基配偶对(例如,“197+367”,“365+206,”“197+400”,“399+206”等)。

[0526] 实施例5:开关CAR的体外评估

[0527] 可评估开关CAR在体外介导对靶肿瘤细胞的杀伤的能力。评估通过注射表达开关CAR的T细胞引起的体外肿瘤细胞杀伤。使用已经在体外确定了表达同源抗原并且可以被表达相应CAR的CD8⁺T细胞杀死的肿瘤细胞系。可使用已经被改造为表达萤火虫荧光蛋白或Renilla荧光蛋白以便能够生物荧光成像来量化体内肿瘤负荷的肿瘤细胞。将肿瘤细胞注射到免疫功能低下的小鼠(例如,6~10周龄的雌性NOD scidγ (NSG)小鼠)中,皮下肿瘤模型通过皮下注射,或系统性肿瘤模型通过静脉内注射。肿瘤移植方法和移植的最佳肿瘤细胞数可基于对于所使用肿瘤细胞系最佳的条件。可通过生物荧光成像和适用时的卡尺测量每周两次监测肿瘤负荷。一旦肿瘤负荷可检测,将总计 $0.5\sim 2.5\times 10^7$ 个表达开关CAR的T细胞(1:1CD4⁺:CD8⁺)静脉内注射到小鼠中以开始治疗。腹膜内施用载剂中的二聚化小分子药物(例如,雷帕霉素类)。在试验期间,可重复注射表达开关CAR的T细胞以增强抗肿瘤效果。可施用白介素2(IL-2)以增强抗肿瘤效果。

[0528] 尽管已经参考本发明的特定实施方案描述了本发明,但是本领域技术人员应理解的是,可进行多种改变和等同物的替换而不脱离本发明的真实精神和范围。此外,可进行许多修改以使特定情况、材料、物质组成、方法、方法步骤或步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改被确定在所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 加利福尼亚大学董事会

<120> 嵌合抗原受体及其使用方法

<130> UCSF-464W0

<150> 61/765,585

<151> 2013-02-15

<160> 145

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 1

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccg 63

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

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
 20

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 3

gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg 30

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 4

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 5

<211> 726

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 5

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgect ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aatatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctacat acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggagatcac aggtggcggg ggctcgggcg gtggtgggtc ggggtggcggc 360
 ggatctgagg tgaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgcctc acagagcctg 420
 tccgtcacat gcactgtctc aggggtctca ttaccgact atggtgtaag ctggattcgc 480
 cagcctccac gaaaggtct ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac 540
 tataattcag ctctcaaac cagactgacc atcatcaagg acaactcaa gagccaagtt 600
 ttcttaaaaa tgaacagtct gcaactgat gacacagcca ttactactg tgccaaacat 660
 tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggcc aaggaacctc agtcaccgctc 720
 tcctca 726

<210> 6

<211> 242

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35	40	45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln		
65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr		
	85	90
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser		
	100	105
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu		
	115	120
Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys		
	130	135
Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg		
145	150	155
Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser		
	165	170
Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile		
	180	185
Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln		
	195	200
Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly		
	210	215
Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val		
225	230	235
		240

Ser Ser

<210> 7

<211> 207

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 7

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60
 tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
 gacttcgect gtgatatcta catctgggag cccttgcccg ggacttgtgg ggtccttctc 180
 ctgtcactgg ttatcaccct ttactgc 207

<210> 8

<211> 69

<212> PRT
 <213> 人工该序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 8
 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> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多核苷酸
 <400> 9
 tccctaggaa gcggtccgg tagcggatct 30
 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 10
 Ser Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多核苷酸
 <400> 11

atgggagtcc aggtggaaac catctcccca ggagacgggc gcaccttccc caagcgcggc 60
 cagacctgcg tgggtgacta caccgggatg cttgaagatg gaaagaaatt tgattcctcc 120
 cgggacagaa acaagccctt taagtttatg ctaggcaagc aggagtgat ccgaggctgg 180
 gaagaagggg ttgccagat gagggtgggt cagagagcca aactgactat atctccagat 240
 tatgcctatg gtgccactgg gcaccaggc atcatccac cacatgccac tctcgtcttc 300
 gatgtggagc ttctaaaact ggaa 324

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

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

<210> 13

<211> 282

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 13

atgatcctct ggcatgagat gtggcatgaa ggcttggag aggcattctcg tttgtacttt 60
 ggggaaagga acgtgaaagg catgtttgag gtgctggagc ccttgcattgc tatgatggaa 120
 cggggccccc agactctgaa ggaaacatcc tttaatcagg cctatggctc agattttaatg 180
 gaggcccaag agtggtgcag gaagtacatg aatcaggga atgtcaagga cctcctccaa 240
 gcctgggacc tctattatca tgtgttccga cgaatctcaa ag 282

<210> 14

<211> 94

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 15

ggaagcgggt ccggtagcgg atcttccta 30

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

```

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser Leu
1           5           10

```

<210> 17

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 17

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc 336

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

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

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 19

tcgagaggaa gcgggtccgg tagcggatct 30

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

Ser Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 708

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 21

atggtgagca agggcgagga ggataacatg gccatcatca aggagtcat gcgcttcaag 60
gtgcacatgg agggctccgt gaacggccac gatttcgaga tcgaggcga gggcgagggc 120
cgcccctacg agggcaccca gaccgccaag ctgaagtgga ccaagggtgg ccccctgccc 180
ttcgctggg acatcctgtc ccctcagttc atgtacggct ccaaggccta cgtgaagcac 240
cccgccgaca tccccgacta ctggaagctg tccttccccg agggcttcaa gtgggagcgc 300
gtgatgaact tcgaggacgg cggcgtggtg accgtgacct aggactctc cctgcaggac 360
ggcgagttca tctacaaggt gaagctgcgc ggcaccaact tcccctccga cggccccgta 420
atgcagaaga agaccatggg ctgggaggcc tcctccgagc ggatgtacct cgaggacggc 480
gccctgaagg gcgagatcaa gcagaggctg aagctgaagg acggcggcca ctacgacgct 540
gaggtcaaga ccacctaca ggccaagaag cccgtgcagc tgcccggcgc ctacaacgctc 600
aacatcaagt tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcgtgga acagtacgaa 660
cgcgccgagg gccgccactc caccggcggc atggacgagc tgtacaag 708

<210> 22

<211> 236

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe

1 5 10 15

Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe

20 25 30

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

<210> 23

<211> 126

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 23

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
 gaactg 126

<210> 24

<211> 42

<212> PRT

65		70		75		80									
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
		85		90		95									
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
		100		105		110									

<210> 27

<211> 144

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 27

atgatccatc tgggtcacat ccttctctctg cttttgctcc cagtggctgc agctcagacg 60
 actccaggag agagatcadc actccctgcc ttttaccctg gcacttcagg ctcttgttcc 120
 ggatgtgggt cctctctctc gccg 144

<210> 28

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 28

Met	Ile	His	Leu	Gly	His	Ile	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Val	Ala
1			5				10						15		
Ala	Ala	Gln	Thr	Thr	Pro	Gly	Glu	Arg	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Phe	Tyr
			20				25						30		
Pro	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Cys	Ser	Gly	Cys	Gly	Ser	Leu	Ser	Leu	Pro
			35				40						45		

<210> 29

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 29

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggctc ttctctgtc actggttacc 60
 accctttact gc 72

<210> 30

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 30

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

<210> 31

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 31

ggttccggca gcggatctgg tagcgggaagc ggggtccgta gcggatct 48

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 32

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 33

<211> 279

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 33

atcctctggc atgagatgtg gcatgaaggc ctggaagagg catctcgttt gtactttggg 60
 gaaaggaacg tgaaaggcat gtttgaggtg ctggagcct tgcattgctat gatggaacgg 120
 ggccccaga ctctgaagga aacatccttt aatcaggcct atggtcgaga tttaatggag 180
 gccaagagt ggtgcaggaa gtacatgaaa tcagggaatg tcaaggacct cctccaagcc 240
 tgggacctct attatcatgt gttccgacga atctcaaag 279

<210> 34

<211> 93

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34

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

<210> 35

<211> 1857

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 35

```

atgccagacc cgcggcgca tctgcccttc ttctacggca gcatctcgcg tgccgaggcc 60
gaggagcacc tgaagctggc gggcatggcg gacgggctct tcttgctgcg ccagtgcctg 120
cgctcgctgg gcggtatgt gctgtcgtc gtgcacgatg tgcgcttcca ccactttccc 180
atcgagcgcc agctcaacgg cacctacgcc attgccggcg gcaaagcgca ctgtggaccg 240
gcagagctct gcgagttcta ctgcgcgac cccgacgggc tgccctgcaa cctgcgcaag 300
ccgtgcaacc ggccgtcggg cctcgagccg cagccggggg tcttcgactg cctgcgagac 360
gccatggtgc gtgactacgt gcgccagacg tggaagctgg agggcgaggc cctggagcag 420
gccatcatca gccaggcccc gcaagtggag aagctcattg ctacgacggc ccacgagcgg 480
atgccctggt accacagcag cctgacgctg gaggaggccg agcgaaact ttactctggg 540
gcgcagaccg acggcaagtt cctgctgagg ccgcggaagg agcagggcac atacgccctg 600
tcctcatct atgggaagac ggtgtaccac tacctcatca gccaagaaa ggcgggcaag 660
tactgcattc ccgagggcac caagtttgac acgctctggc agctggtgga gtatctgaag 720
ctgaaggcgg acgggctcat ctactgctg aaggaggcct gcccacacag cagtgccagc 780
aacgcctcag gggctgctgc tcccacactc ccagcccacc catccacgtt gactcatcct 840

```

cagagacgaa tcgacaccct caactcagat ggatacacce ctgagccagc acgcataacg 900
 tccccagaca aaccgcggcc gatgcccatg gacacgagcg tgtatgagag cccctacagc 960
 gacccagagg agctcaagga caagaagctc ttctgaagc gcgataacct cctcatagct 1020
 gacattgaac ttggctgcgg caactttggc tcagtgcgcc agggcgtgta ccgcatgcgc 1080
 aagaagcaga tcgacgtggc catcaaggtg ctgaagcagg gcacggagaa ggcagacacg 1140
 gaagagatga tgcgagaggc gcagatcatg caccagctgg acaacccta catcgtgcgg 1200
 ctcatgtggc tctgccaggc cgaggccctc atgctggtca tggagatggc tgggggcggg 1260
 ccgctgcaca agttcctggt cggcaagagg gaggagatcc ctgtgagcaa tgtggccgag 1320
 ctgctgcacc aggtgtccat ggggatgaag tacctggagg agaagaactt tgtgcaccgt 1380
 gacctggcgg cccgcaacgt cctgctggtt aaccggcact acgccaagat cagcgacttt 1440
 ggccctctcca aagcaactggg tgccgacgac agctactaca ctgccgctc agcaggaag 1500
 tggccgctca agtggtacgc acccgaatgc atcaacttc gcaagttctc cagccgcagc 1560
 gatgtctgga gctatgggggt caccatgtgg gaggccttgt cctacggcca gaagccctac 1620
 aagaagatga aagggccgga ggtcatggcc ttcacgagc agggcaagcg gatggagtgc 1680
 ccaccagagt gtccaccgca actgtacgca ctcatgagt actgctggat ctacaagtgg 1740
 gaggatcgcc ccgacttctt gaccgtggag cagcgcagtc gagcctgtta ctacagcctg 1800
 gccagcaagg tggaagggcc cccaggcagc acacagaagg ctgaggctgc ctgtgcc 1857

<210> 36

<211> 619

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 36

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

115	120	125
Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly	Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser	
130	135	140
Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg		
145	150	155
Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys		
165	170	175
Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg		
180	185	190
Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val		
195	200	205
Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro		
210	215	220
Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys		
225	230	235
Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn		
245	250	255
Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala		
260	265	270
His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn		
275	280	285
Ser Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys		
290	295	300
Pro Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser		
305	310	315
Asp Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn		
325	330	335
Leu Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val		
340	345	350
Arg Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile		
355	360	365
Lys Val Leu Lys Gln Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met		
370	375	380
Arg Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg		
385	390	395
Leu Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met		
405	410	415
Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu		
420	425	430

Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly
 435 440 445
 Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 450 455 460
 Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe
 465 470 475 480
 Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg
 485 490 495
 Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn
 500 505 510
 Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
 515 520 525
 Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys
 530 535 540
 Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys
 545 550 555 560
 Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp
 565 570 575
 Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg
 580 585 590
 Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro
 595 600 605
 Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala
 610 615

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 重复

<222> (1) .. (5)

<223> 该区域中的氨基酸可以重复n次,其中n是至少为1的整数

<400> 37

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 38

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 重复

<222> (1) .. (4)

<223> 该区域中的氨基酸可以重复n次,其中n是至少为1的整数

<400> 38

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 39

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 40

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 41

Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

<210> 42

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 42
Gly Ser Gly Gly Gly
1 5
<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 43
Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 44
Gly Ser Ser Ser Gly
1 5
<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 45
Asp Lys Thr His Thr
1 5
<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 46

Cys Pro Pro Cys

1

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 47

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

1

5

10

15

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 48

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr

1

5

10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 49

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1

5

10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 50

Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro

1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 51

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 52

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 53

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 54

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro

<400> 58

Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly
 1 5 10 15
 Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys
 20 25

<210> 59

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 59

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
 1 5 10 15
 Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
 20

<210> 60

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 60

Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 20 25

<210> 61

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 61

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro
 1 5 10 15
 Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 20 25

<210> 62

His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu
 1 5 10 15
 Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser
 20 25 30
 Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser
 35 40 45
 Pro
 <210> 68
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 68
 Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr
 1 5 10 15
 Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro
 20 25 30
 Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro
 35 40 45
 Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys
 50 55 60
 His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala
 65 70 75 80
 Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg
 85 90 95
 Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met
 100 105 110
 Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu
 115 120 125
 Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu
 130 135 140
 Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro
 145 150 155 160
 Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys
 165 170 175
 Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys
 180 185

<210> 69

<211> 54

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 69

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

<210> 70

<211> 60

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 70

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

<210> 71

<211> 292

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 71

Leu	Glu	Glu	Ser	Val	Ala	Leu	Arg	Ile	Ile	Thr	Glu	Gly	Ala	Ser	Ile
1				5						10				15	
Leu	Arg	Gln	Glu	Lys	Asn	Leu	Leu	Asp	Ile	Asp	Ala	Pro	Val	Thr	Val

<220>

<223> 合成多肽

<400> 72

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

<210> 73

<211> 804

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 73

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

50	55	60
Ala Asp Asn Ser Val	Ser Val Gln Asp Asp Gly Arg Gly Ile Pro Thr	
65	70	75
Gly Ile His Pro Glu	Glu Gly Val Ser Ala Ala Glu Val Ile Met Thr	80
	85	90
Val Leu His Ala Gly	Gly Lys Phe Asp Asp Asn Ser Tyr Lys Val Ser	95
	100	105
Gly Gly Leu His Gly	Val Gly Val Ser Val Val Asn Ala Leu Ser Gln	110
	115	120
Lys Leu Glu Leu Val	Ile Gln Arg Glu Gly Lys Ile His Arg Gln Ile	125
	130	135
Tyr Glu His Gly Val	Pro Gln Ala Pro Leu Ala Val Thr Gly Glu Thr	140
	145	150
Glu Lys Thr Gly Thr	Met Val Arg Phe Trp Pro Ser Leu Glu Thr Phe	155
	165	170
Thr Asn Val Thr Glu	Phe Glu Tyr Glu Ile Leu Ala Lys Arg Leu Arg	160
	180	185
Glu Leu Ser Phe Leu	Asn Ser Gly Val Ser Ile Arg Leu Arg Asp Lys	190
	195	200
Arg Asp Gly Lys Glu	Asp His Phe His Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Ala	205
	210	215
Phe Val Glu Tyr Leu	Asn Lys Asn Lys Thr Pro Ile His Pro Asn Ile	220
	225	230
Phe Tyr Phe Ser Thr	Glu Lys Asp Gly Ile Gly Val Glu Val Ala Leu	235
	245	250
Gln Trp Asn Asp Gly	Phe Gln Glu Asn Ile Tyr Cys Phe Thr Asn Asn	240
	260	265
Ile Pro Gln Arg Asp	Gly Gly Thr His Leu Ala Gly Phe Arg Ala Ala	255
	275	280
Met Thr Arg Thr Leu	Asn Ala Tyr Met Asp Lys Glu Gly Tyr Ser Lys	285
	290	295
Lys Ala Lys Val Ser	Ala Thr Gly Asp Asp Ala Arg Glu Gly Leu Ile	300
	305	310
Ala Val Val Ser Val	Lys Val Pro Asp Pro Lys Phe Ser Ser Gln Thr	315
	325	330
Lys Asp Lys Leu Val	Ser Ser Glu Val Lys Ser Ala Val Glu Gln Gln	320
	340	345
Met Asn Glu Leu Leu	Ala Glu Tyr Leu Leu Glu Asn Pro Thr Asp Ala	335
	355	360
		365

Lys Ile Val Val Gly Lys Ile Ile Asp Ala Ala Arg Ala Arg Glu Ala
 370 375 380
 Ala Arg Arg Ala Arg Glu Met Thr Arg Arg Lys Gly Ala Leu Asp Leu
 385 390 395 400
 Ala Gly Leu Pro Gly Lys Leu Ala Asp Cys Gln Glu Arg Asp Pro Ala
 405 410 415
 Leu Ser Glu Leu Tyr Leu Val Glu Gly Asp Ser Ala Gly Gly Ser Ala
 420 425 430
 Lys Gln Gly Arg Asn Arg Lys Asn Gln Ala Ile Leu Pro Leu Lys Gly
 435 440 445
 Lys Ile Leu Asn Val Glu Lys Ala Arg Phe Asp Lys Met Leu Ser Ser
 450 455 460
 Gln Glu Val Ala Thr Leu Ile Thr Ala Leu Gly Cys Gly Ile Gly Arg
 465 470 475 480
 Asp Glu Tyr Asn Pro Asp Lys Leu Arg Tyr His Ser Ile Ile Ile Met
 485 490 495
 Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Ser His Ile Arg Thr Leu Leu Leu Thr
 500 505 510
 Phe Phe Tyr Arg Gln Met Pro Glu Ile Val Glu Arg Gly His Val Tyr
 515 520 525
 Ile Ala Gln Pro Pro Leu Tyr Lys Val Lys Lys Gly Lys Gln Glu Gln
 530 535 540
 Tyr Ile Lys Asp Asp Glu Ala Met Asp Gln Tyr Gln Ile Ser Ile Ala
 545 550 555 560
 Leu Asp Gly Ala Thr Leu His Thr Asn Ala Ser Ala Pro Ala Leu Ala
 565 570 575
 Gly Glu Ala Leu Glu Lys Leu Val Ser Glu Tyr Asn Ala Thr Gln Lys
 580 585 590
 Met Ile Asn Arg Met Glu Arg Arg Tyr Pro Lys Ala Met Leu Lys Glu
 595 600 605
 Leu Ile Tyr Gln Pro Thr Leu Thr Glu Ala Asp Leu Ser Asp Glu Gln
 610 615 620
 Thr Val Thr Arg Trp Val Asn Ala Leu Val Ser Glu Leu Asn Asp Lys
 625 630 635 640
 Glu Gln His Gly Ser Gln Trp Lys Phe Asp Val His Thr Asn Ala Glu
 645 650 655
 Gln Asn Leu Phe Glu Pro Ile Val Arg Val Arg Thr His Gly Val Asp
 660 665 670
 Thr Asp Tyr Pro Leu Asp His Glu Phe Ile Thr Gly Gly Glu Tyr Arg

675	680	685
Arg Ile Cys Thr Leu Gly	Glu Lys Leu Arg Gly	Leu Leu Glu Glu Asp
690	695	700
Ala Phe Ile Glu Arg Gly	Glu Arg Arg Gln Pro Val	Ala Ser Phe Glu
705	710	715
Gln Ala Leu Asp Trp Leu	Val Lys Glu Ser Arg Arg	Gly Leu Ser Ile
725	730	735
Gln Arg Tyr Lys Gly Leu	Gly Glu Met Asn Pro Glu	Gln Leu Trp Glu
740	745	750
Thr Thr Met Asp Pro Glu	Ser Arg Arg Met Leu Arg	Val Thr Val Lys
755	760	765
Asp Ala Ile Ala Ala Asp	Gln Leu Phe Thr Thr	Leu Met Gly Asp Ala
770	775	780
Val Glu Pro Arg Arg Ala	Phe Ile Glu Glu Asn Ala	Leu Lys Ala Ala
785	790	795
Asn Ile Asp Ile		
<210> 74		
<211> 187		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 74		
Met Val Gly Ser Leu Asn	Cys Ile Val Ala Val Ser	Gln Asn Met Gly
1	5	10
Ile Gly Lys Asn Gly Asp	Leu Pro Trp Pro Pro	Leu Arg Asn Glu Phe
20	25	30
Arg Tyr Phe Gln Arg Met	Thr Thr Thr Ser Ser	Val Glu Gly Lys Gln
35	40	45
Asn Leu Val Ile Met Gly	Lys Lys Thr Trp Phe Ser	Ile Pro Glu Lys
50	55	60
Asn Arg Pro Leu Lys Gly	Arg Ile Asn Leu Val Leu	Ser Arg Glu Leu
65	70	75
Lys Glu Pro Pro Gln Gly	Ala His Phe Leu Ser Arg	Ser Leu Asp Asp
85	90	95
Ala Leu Lys Leu Thr Glu	Gln Pro Glu Leu Ala Asn	Lys Val Asp Met
100	105	110
Val Trp Ile Val Gly Gly	Ser Ser Val Tyr Lys Glu	Ala Met Asn His
115	120	125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140
 Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175
 Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 75

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 75

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

<210> 76

<211> 183

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 76

Met Asn Gly Asp Glu Thr Lys Lys Val Glu Ser Glu Tyr Ile Lys Lys
 1 5 10 15
 His His Arg His Glu Leu Val Glu Ser Gln Cys Ser Ser Thr Leu Val

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

<210> 77
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 77

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

	85	90	95
Val Asn Tyr Arg Ser Lys Thr Met Ala Phe Val Ala Ala Asp Thr Glu			
	100	105	110
Glu Lys Thr Val Val Val Glu Ser Tyr Val Val Asp Val Pro Glu Gly			
	115	120	125
Asn Ser Glu Glu Glu Thr Thr Ser Phe Ala Asp Thr Ile Val Gly Phe			
	130	135	140
Asn Leu Lys Ser Leu Ala Lys Leu Ser Glu Arg Val Ala His Leu Lys			
145	150	155	160
Leu			
<210> 78			
<211> 159			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 78			
Met Lys Thr Ser Gln Glu Gln His Val Cys Gly Ser Thr Val Val Gln			
1	5	10	15
Thr Ile Asn Ala Pro Leu Pro Leu Val Trp Ser Ile Leu Arg Arg Phe			
	20	25	30
Asp Asn Pro Lys Thr Phe Lys His Phe Val Lys Thr Cys Lys Leu Arg			
	35	40	45
Ser Gly Asp Gly Gly Glu Gly Ser Val Arg Glu Val Thr Val Val Ser			
	50	55	60
Asp Leu Pro Ala Ser Phe Ser Leu Glu Arg Leu Asp Glu Leu Asp Asp			
65	70	75	80
Glu Ser His Val Met Val Ile Ser Ile Ile Gly Gly Asp His Arg Leu			
	85	90	95
Val Asn Tyr Gln Ser Lys Thr Thr Val Phe Val Ala Ala Glu Glu Glu			
	100	105	110
Lys Thr Val Val Val Glu Ser Tyr Val Val Asp Val Pro Glu Gly Asn			
	115	120	125
Thr Glu Glu Glu Thr Thr Leu Phe Ala Asp Thr Ile Val Gly Cys Asn			
	130	135	140
Leu Arg Ser Leu Ala Lys Leu Ser Glu Lys Met Met Glu Leu Thr			
145	150	155	
<210> 79			
<211> 164			

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 79

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

<210> 80

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 80

Met Ala Asn Ser Glu Ser Ser Ser Ser Pro Val Asn Glu Glu Glu Asn
 1 5 10 15
 Ser Gln Arg Ile Ser Thr Leu His His Gln Thr Met Pro Ser Asp Leu
 20 25 30
 Thr Gln Asp Glu Phe Thr Gln Leu Ser Gln Ser Ile Ala Glu Phe His
 35 40 45

Thr Tyr Gln Leu Gly Asn Gly Arg Cys Ser Ser Leu Leu Ala Gln Arg
 50 55 60
 Ile His Ala Pro Pro Glu Thr Val Trp Ser Val Val Arg Arg Phe Asp
 65 70 75 80
 Arg Pro Gln Ile Tyr Lys His Phe Ile Lys Ser Cys Asn Val Ser Glu
 85 90 95
 Asp Phe Glu Met Arg Val Gly Cys Thr Arg Asp Val Asn Val Ile Ser
 100 105 110
 Gly Leu Pro Ala Asn Thr Ser Arg Glu Arg Leu Asp Leu Leu Asp Asp
 115 120 125
 Asp Arg Arg Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu His Arg Leu
 130 135 140
 Arg Asn Tyr Lys Ser Val Thr Thr Val His Arg Phe Glu Lys Glu Glu
 145 150 155 160
 Glu Glu Glu Arg Ile Trp Thr Val Val Leu Glu Ser Tyr Val Val Asp
 165 170 175
 Val Pro Glu Gly Asn Ser Glu Glu Asp Thr Arg Leu Phe Ala Asp Thr
 180 185 190
 Val Ile Arg Leu Asn Leu Gln Lys Leu Ala Ser Ile Thr Glu Ala Met
 195 200 205
 Asn Arg Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Ser Gln Val Arg
 210 215 220
 <210> 81
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 81
 Met Ser Ser Ser Pro Ala Val Lys Gly Leu Thr Asp Glu Glu Gln Lys
 1 5 10 15
 Thr Leu Glu Pro Val Ile Lys Thr Tyr His Gln Phe Glu Pro Asp Pro
 20 25 30
 Thr Thr Cys Thr Ser Leu Ile Thr Gln Arg Ile His Ala Pro Ala Ser
 35 40 45
 Val Val Trp Pro Leu Ile Arg Arg Phe Asp Asn Pro Glu Arg Tyr Lys
 50 55 60
 His Phe Val Lys Arg Cys Arg Leu Ile Ser Gly Asp Gly Asp Val Gly
 65 70 75 80

Ser Val Arg Glu Val Thr Val Ile Ser Gly Leu Pro Ala Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Glu Arg Leu Glu Phe Val Asp Asp Asp His Arg Val Leu Ser Phe
 100 105 110
 Arg Val Val Gly Gly Glu His Arg Leu Lys Asn Tyr Lys Ser Val Thr
 115 120 125
 Ser Val Asn Glu Phe Leu Asn Gln Asp Ser Gly Lys Val Tyr Thr Val
 130 135 140
 Val Leu Glu Ser Tyr Thr Val Asp Ile Pro Glu Gly Asn Thr Glu Glu
 145 150 155 160
 Asp Thr Lys Met Phe Val Asp Thr Val Val Lys Leu Asn Leu Gln Lys
 165 170 175
 Leu Gly Val Ala Ala Thr Ser Ala Pro Met His Asp Asp Glu
 180 185 190
 <210> 82
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 82
 Met Asn Leu Ala Pro Ile His Asp Pro Ser Ser Ser Ser Thr Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Ser Ser Ser Thr Pro Tyr Gly Leu Thr Lys Asp Glu Phe Ser Thr
 20 25 30
 Leu Asp Ser Ile Ile Arg Thr His His Thr Phe Pro Arg Ser Pro Asn
 35 40 45
 Thr Cys Thr Ser Leu Ile Ala His Arg Val Asp Ala Pro Ala His Ala
 50 55 60
 Ile Trp Arg Phe Val Arg Asp Phe Ala Asn Pro Asn Lys Tyr Lys His
 65 70 75 80
 Phe Ile Lys Ser Cys Thr Ile Arg Val Asn Gly Asn Gly Ile Lys Glu
 85 90 95
 Ile Lys Val Gly Thr Ile Arg Glu Val Ser Val Val Ser Gly Leu Pro
 100 105 110
 Ala Ser Thr Ser Val Glu Ile Leu Glu Val Leu Asp Glu Glu Lys Arg
 115 120 125
 Ile Leu Ser Phe Arg Val Leu Gly Gly Glu His Arg Leu Asn Asn Tyr
 130 135 140

	180		185		190
Ile Ala Glu Asn Thr Ala Ala Glu Ser Lys Lys Lys Met Ser Leu					
	195		200		205
<210> 84					
<211> 203					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成多肽					
<400> 84					
Met Arg Ser Pro Val Gln Leu Gln His Gly Ser Asp Ala Thr Asn Gly					
1	5		10		15
Phe His Thr Leu Gln Pro His Asp Gln Thr Asp Gly Pro Ile Lys Arg					
	20		25		30
Val Cys Leu Thr Arg Gly Met His Val Pro Glu His Val Ala Met His					
	35		40		45
His Thr His Asp Val Gly Pro Asp Gln Cys Cys Ser Ser Val Val Gln					
	50		55		60
Met Ile His Ala Pro Pro Glu Ser Val Trp Ala Leu Val Arg Arg Phe					
65	70		75		80
Asp Asn Pro Lys Val Tyr Lys Asn Phe Ile Arg Gln Cys Arg Ile Val					
	85		90		95
Gln Gly Asp Gly Leu His Val Gly Asp Leu Arg Glu Val Met Val Val					
	100		105		110
Ser Gly Leu Pro Ala Val Ser Ser Thr Glu Arg Leu Glu Ile Leu Asp					
	115		120		125
Glu Glu Arg His Val Ile Ser Phe Ser Val Val Gly Gly Asp His Arg					
	130		135		140
Leu Lys Asn Tyr Arg Ser Val Thr Thr Leu His Ala Ser Asp Asp Glu					
145	150		155		160
Gly Thr Val Val Val Glu Ser Tyr Ile Val Asp Val Pro Pro Gly Asn					
	165		170		175
Thr Glu Glu Glu Thr Leu Ser Phe Val Asp Thr Ile Val Arg Cys Asn					
	180		185		190
Leu Gln Ser Leu Ala Arg Ser Thr Asn Arg Gln					
	195		200		
<210> 85					
<211> 215					
<212> PRT					

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 85

```

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

```

<210> 86

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 86

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

Thr Asn Leu

210

<210> 87

<211> 188

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 87

Met Glu Ala Asn Gly Ile Glu Asn Leu Thr Asn Pro Asn Gln Glu Arg
 1 5 10 15
 Glu Phe Ile Arg Arg His His Lys His Glu Leu Val Asp Asn Gln Cys
 20 25 30

Ser Ser Thr Leu Val Lys His Ile Asn Ala Pro Val His Ile Val Trp
 35 40 45
 Ser Leu Val Arg Arg Phe Asp Gln Pro Gln Lys Tyr Lys Pro Phe Ile
 50 55 60
 Ser Arg Cys Val Val Lys Gly Asn Met Glu Ile Gly Thr Val Arg Glu
 65 70 75 80
 Val Asp Val Lys Ser Gly Leu Pro Ala Thr Arg Ser Thr Glu Arg Leu
 85 90 95
 Glu Leu Leu Asp Asp Asn Glu His Ile Leu Ser Ile Arg Ile Val Gly
 100 105 110
 Gly Asp His Arg Leu Lys Asn Tyr Ser Ser Ile Ile Ser Leu His Pro
 115 120 125
 Glu Thr Ile Glu Gly Arg Ile Gly Thr Leu Val Ile Glu Ser Phe Val
 130 135 140
 Val Asp Val Pro Glu Gly Asn Thr Lys Asp Glu Thr Cys Tyr Phe Val
 145 150 155 160
 Glu Ala Leu Ile Lys Cys Asn Leu Lys Ser Leu Ala Asp Ile Ser Glu
 165 170 175
 Arg Leu Ala Val Gln Asp Thr Thr Glu Ser Arg Val
 180 185

<210> 88

<211> 187

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 88

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

Arg Leu Glu Leu Leu Asp Asp Glu Glu His Ile Leu Gly Ile Lys Ile
 100 105 110
 Ile Gly Gly Asp His Arg Leu Lys Asn Tyr Ser Ser Ile Leu Thr Val
 115 120 125
 His Pro Glu Ile Ile Glu Gly Arg Ala Gly Thr Met Val Ile Glu Ser
 130 135 140
 Phe Val Val Asp Val Pro Gln Gly Asn Thr Lys Asp Glu Thr Cys Tyr
 145 150 155 160
 Phe Val Glu Ala Leu Ile Arg Cys Asn Leu Lys Ser Leu Ala Asp Val
 165 170 175
 Ser Glu Arg Leu Ala Ser Gln Asp Ile Thr Gln
 180 185

<210> 89

<211> 191

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 89

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

Asp Thr Val Val Lys Leu Asn Leu Gln Lys Leu Ala Thr Val Ala Glu
 165 170 175
 Ala Met Ala Arg Asn Ser Gly Asp Gly Ser Gly Ser Gln Val Thr
 180 185 190
 <210> 90
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 90
 Met Glu Glu Val Ser Pro Ala Ile Ala Gly Pro Phe Arg Pro Phe Ser
 1 5 10 15
 Glu Thr Gln Met Asp Phe Thr Gly Ile Arg Leu Gly Lys Gly Tyr Cys
 20 25 30
 Asn Asn Gln Tyr Ser Asn Gln Asp Ser Glu Asn Gly Asp Leu Met Val
 35 40 45
 Ser Leu Pro Glu Thr Ser Ser Cys Ser Val Ser Gly Ser His Gly Ser
 50 55 60
 Glu Ser Arg Lys Val Leu Ile Ser Arg Ile Asn Ser Pro Asn Leu Asn
 65 70 75 80
 Met Lys Glu Ser Ala Ala Ala Asp Ile Val Val Val Asp Ile Ser Ala
 85 90 95
 Gly Asp Glu Ile Asn Gly Ser Asp Ile Thr Ser Glu Lys Lys Met Ile
 100 105 110
 Ser Arg Thr Glu Ser Arg Ser Leu Phe Glu Phe Lys Ser Val Pro Leu
 115 120 125
 Tyr Gly Phe Thr Ser Ile Cys Gly Arg Arg Pro Glu Met Glu Asp Ala
 130 135 140
 Val Ser Thr Ile Pro Arg Phe Leu Gln Ser Ser Ser Gly Ser Met Leu
 145 150 155 160
 Asp Gly Arg Phe Asp Pro Gln Ser Ala Ala His Phe Phe Gly Val Tyr
 165 170 175
 Asp Gly His Gly Gly Ser Gln Val Ala Asn Tyr Cys Arg Glu Arg Met
 180 185 190
 His Leu Ala Leu Ala Glu Glu Ile Ala Lys Glu Lys Pro Met Leu Cys
 195 200 205
 Asp Gly Asp Thr Trp Leu Glu Lys Trp Lys Lys Ala Leu Phe Asn Ser
 210 215 220

Phe Leu Arg Val Asp Ser Glu Ile Glu Ser Val Ala Pro Glu Thr Val
 225 230 235 240
 Gly Ser Thr Ser Val Val Ala Val Val Phe Pro Ser His Ile Phe Val
 245 250 255
 Ala Asn Cys Gly Asp Ser Arg Ala Val Leu Cys Arg Gly Lys Thr Ala
 260 265 270
 Leu Pro Leu Ser Val Asp His Lys Pro Asp Arg Glu Asp Glu Ala Ala
 275 280 285
 Arg Ile Glu Ala Ala Gly Gly Lys Val Ile Gln Trp Asn Gly Ala Arg
 290 295 300
 Val Phe Gly Val Leu Ala Met Ser Arg Ser Ile Gly Asp Arg Tyr Leu
 305 310 315 320
 Lys Pro Ser Ile Ile Pro Asp Pro Glu Val Thr Ala Val Lys Arg Val
 325 330 335
 Lys Glu Asp Asp Cys Leu Ile Leu Ala Ser Asp Gly Val Trp Asp Val
 340 345 350
 Met Thr Asp Glu Glu Ala Cys Glu Met Ala Arg Lys Arg Ile Leu Leu
 355 360 365
 Trp His Lys Lys Asn Ala Val Ala Gly Asp Ala Ser Leu Leu Ala Asp
 370 375 380
 Glu Arg Arg Lys Glu Gly Lys Asp Pro Ala Ala Met Ser Ala Ala Glu
 385 390 395 400
 Tyr Leu Ser Lys Leu Ala Ile Gln Arg Gly Ser Lys Asp Asn Ile Ser
 405 410 415
 Val Val Val Val Asp Leu Lys Pro Arg Arg Lys Leu Lys Ser Lys Pro
 420 425 430

Leu Asn

<210> 91

<211> 423

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 91

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

35	40	45
Ser Phe Glu Ile Asn Thr Arg Gln Asp Ser Leu Thr Ser Ser Ser Ser		
50	55	60
Ala Met Ala Gly Val Asp Ile Ser Ala Gly Asp Glu Ile Asn Gly Ser		
65	70	75
Asp Glu Phe Asp Pro Arg Ser Met Asn Gln Ser Glu Lys Lys Val Leu		
85	90	95
Ser Arg Thr Glu Ser Arg Ser Leu Phe Glu Phe Lys Cys Val Pro Leu		
100	105	110
Tyr Gly Val Thr Ser Ile Cys Gly Arg Arg Pro Glu Met Glu Asp Ser		
115	120	125
Val Ser Thr Ile Pro Arg Phe Leu Gln Val Ser Ser Ser Ser Leu Leu		
130	135	140
Asp Gly Arg Val Thr Asn Gly Phe Asn Pro His Leu Ser Ala His Phe		
145	150	155
Phe Gly Val Tyr Asp Gly His Gly Gly Ser Gln Val Ala Asn Tyr Cys		
165	170	175
Arg Glu Arg Met His Leu Ala Leu Thr Glu Glu Ile Val Lys Glu Lys		
180	185	190
Pro Glu Phe Cys Asp Gly Asp Thr Trp Gln Glu Lys Trp Lys Lys Ala		
195	200	205
Leu Phe Asn Ser Phe Met Arg Val Asp Ser Glu Ile Glu Thr Val Ala		
210	215	220
His Ala Pro Glu Thr Val Gly Ser Thr Ser Val Val Ala Val Val Phe		
225	230	235
Pro Thr His Ile Phe Val Ala Asn Cys Gly Asp Ser Arg Ala Val Leu		
245	250	255
Cys Arg Gly Lys Thr Pro Leu Ala Leu Ser Val Asp His Lys Pro Asp		
260	265	270
Arg Asp Asp Glu Ala Ala Arg Ile Glu Ala Ala Gly Gly Lys Val Ile		
275	280	285
Arg Trp Asn Gly Ala Arg Val Phe Gly Val Leu Ala Met Ser Arg Ser		
290	295	300
Ile Gly Asp Arg Tyr Leu Lys Pro Ser Val Ile Pro Asp Pro Glu Val		
305	310	315
Thr Ser Val Arg Arg Val Lys Glu Asp Asp Cys Leu Ile Leu Ala Ser		
325	330	335
Asp Gly Leu Trp Asp Val Met Thr Asn Glu Glu Val Cys Asp Leu Ala		
340	345	350

Arg Lys Arg Ile Leu Leu Trp His Lys Lys Asn Ala Met Ala Gly Glu
 355 360 365
 Ala Leu Leu Pro Ala Glu Lys Arg Gly Glu Gly Lys Asp Pro Ala Ala
 370 375 380
 Met Ser Ala Ala Glu Tyr Leu Ser Lys Met Ala Leu Gln Lys Gly Ser
 385 390 395 400
 Lys Asp Asn Ile Ser Val Val Val Val Asp Leu Lys Gly Ile Arg Lys
 405 410 415
 Phe Lys Ser Lys Ser Leu Asn
 420
 <210> 92
 <211> 612
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 92
 Met Lys Met Asp Lys Lys Thr Ile Val Trp Phe Arg Arg Asp Leu Arg
 1 5 10 15
 Ile Glu Asp Asn Pro Ala Leu Ala Ala Ala His Glu Gly Ser Val
 20 25 30
 Phe Pro Val Phe Ile Trp Cys Pro Glu Glu Glu Gly Gln Phe Tyr Pro
 35 40 45
 Gly Arg Ala Ser Arg Trp Trp Met Lys Gln Ser Leu Ala His Leu Ser
 50 55 60
 Gln Ser Leu Lys Ala Leu Gly Ser Asp Leu Thr Leu Ile Lys Thr His
 65 70 75 80
 Asn Thr Ile Ser Ala Ile Leu Asp Cys Ile Arg Val Thr Gly Ala Thr
 85 90 95
 Lys Val Val Phe Asn His Leu Tyr Asp Pro Val Ser Leu Val Arg Asp
 100 105 110
 His Thr Val Lys Glu Lys Leu Val Glu Arg Gly Ile Ser Val Gln Ser
 115 120 125
 Tyr Asn Gly Asp Leu Leu Tyr Glu Pro Trp Glu Ile Tyr Cys Glu Lys
 130 135 140
 Gly Lys Pro Phe Thr Ser Phe Asn Ser Tyr Trp Lys Lys Cys Leu Asp
 145 150 155 160
 Met Ser Ile Glu Ser Val Met Leu Pro Pro Pro Trp Arg Leu Met Pro
 165 170 175

Ile Thr Ala Ala Ala Glu Ala Ile Trp Ala Cys Ser Ile Glu Glu Leu
 180 185 190
 Gly Leu Glu Asn Glu Ala Glu Lys Pro Ser Asn Ala Leu Leu Thr Arg
 195 200 205
 Ala Trp Ser Pro Gly Trp Ser Asn Ala Asp Lys Leu Leu Asn Glu Phe
 210 215 220
 Ile Glu Lys Gln Leu Ile Asp Tyr Ala Lys Asn Ser Lys Lys Val Val
 225 230 235 240
 Gly Asn Ser Thr Ser Leu Leu Ser Pro Tyr Leu His Phe Gly Glu Ile
 245 250 255
 Ser Val Arg His Val Phe Gln Cys Ala Arg Met Lys Gln Ile Ile Trp
 260 265 270
 Ala Arg Asp Lys Asn Ser Glu Gly Glu Glu Ser Ala Asp Leu Phe Leu
 275 280 285
 Arg Gly Ile Gly Leu Arg Glu Tyr Ser Arg Tyr Ile Cys Phe Asn Phe
 290 295 300
 Pro Phe Thr His Glu Gln Ser Leu Leu Ser His Leu Arg Phe Phe Pro
 305 310 315 320
 Trp Asp Ala Asp Val Asp Lys Phe Lys Ala Trp Arg Gln Gly Arg Thr
 325 330 335
 Gly Tyr Pro Leu Val Asp Ala Gly Met Arg Glu Leu Trp Ala Thr Gly
 340 345 350
 Trp Met His Asn Arg Ile Arg Val Ile Val Ser Ser Phe Ala Val Lys
 355 360 365
 Phe Leu Leu Leu Pro Trp Lys Trp Gly Met Lys Tyr Phe Trp Asp Thr
 370 375 380
 Leu Leu Asp Ala Asp Leu Glu Cys Asp Ile Leu Gly Trp Gln Tyr Ile
 385 390 395 400
 Ser Gly Ser Ile Pro Asp Gly His Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Pro
 405 410 415
 Ala Leu Gln Gly Ala Lys Tyr Asp Pro Glu Gly Glu Tyr Ile Arg Gln
 420 425 430
 Trp Leu Pro Glu Leu Ala Arg Leu Pro Thr Glu Trp Ile His His Pro
 435 440 445
 Trp Asp Ala Pro Leu Thr Val Leu Lys Ala Ser Gly Val Glu Leu Gly
 450 455 460
 Thr Asn Tyr Ala Lys Pro Ile Val Asp Ile Asp Thr Ala Arg Glu Leu
 465 470 475 480
 Leu Ala Lys Ala Ile Ser Arg Thr Arg Glu Ala Gln Ile Met Ile Gly

	485	490	495
Ala Ala Pro Asp Glu Ile Val Ala Asp Ser Phe Glu Ala Leu Gly Ala			
	500	505	510
Asn Thr Ile Lys Glu Pro Gly Leu Cys Pro Ser Val Ser Ser Asn Asp			
	515	520	525
Gln Gln Val Pro Ser Ala Val Arg Tyr Asn Gly Ser Lys Arg Val Lys			
	530	535	540
Pro Glu Glu Glu Glu Glu Arg Asp Met Lys Lys Ser Arg Gly Phe Asp			
545	550	555	560
Glu Arg Glu Leu Phe Ser Thr Ala Glu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Val			
	565	570	575
Phe Phe Val Ser Gln Ser Cys Ser Leu Ala Ser Glu Gly Lys Asn Leu			
	580	585	590
Glu Gly Ile Gln Asp Ser Ser Asp Gln Ile Thr Thr Ser Leu Gly Lys			
	595	600	605
Asn Gly Cys Lys			
610			
<210> 93			
<211> 335			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 93			
Met Asn Gly Ala Ile Gly Gly Asp Leu Leu Leu Asn Phe Pro Asp Met			
1	5	10	15
Ser Val Leu Glu Arg Gln Arg Ala His Leu Lys Tyr Leu Asn Pro Thr			
	20	25	30
Phe Asp Ser Pro Leu Ala Gly Phe Phe Ala Asp Ser Ser Met Ile Thr			
	35	40	45
Gly Gly Glu Met Asp Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Gly Leu Asn Leu Pro			
	50	55	60
Met Met Tyr Gly Glu Thr Thr Val Glu Gly Asp Ser Arg Leu Ser Ile			
65	70	75	80
Ser Pro Glu Thr Thr Leu Gly Thr Gly Asn Phe Lys Lys Arg Lys Phe			
	85	90	95
Asp Thr Glu Thr Lys Asp Cys Asn Glu Lys Lys Lys Lys Met Thr Met			
	100	105	110
Asn Arg Asp Asp Leu Val Glu Glu Gly Glu Glu Glu Lys Ser Lys Ile			

115	120	125
Thr Glu Gln Asn Asn Gly Ser Thr Lys Ser Ile Lys Lys Met Lys His		
130	135	140
Lys Ala Lys Lys Glu Glu Asn Asn Phe Ser Asn Asp Ser Ser Lys Val		
145	150	155
Thr Lys Glu Leu Glu Lys Thr Asp Tyr Ile His Val Arg Ala Arg Arg		
165	170	175
Gly Gln Ala Thr Asp Ser His Ser Ile Ala Glu Arg Val Arg Arg Glu		
180	185	190
Lys Ile Ser Glu Arg Met Lys Phe Leu Gln Asp Leu Val Pro Gly Cys		
195	200	205
Asp Lys Ile Thr Gly Lys Ala Gly Met Leu Asp Glu Ile Ile Asn Tyr		
210	215	220
Val Gln Ser Leu Gln Arg Gln Ile Glu Phe Leu Ser Met Lys Leu Ala		
225	230	235
Ile Val Asn Pro Arg Pro Asp Phe Asp Met Asp Asp Ile Phe Ala Lys		
245	250	255
Glu Val Ala Ser Thr Pro Met Thr Val Val Pro Ser Pro Glu Met Val		
260	265	270
Leu Ser Gly Tyr Ser His Glu Met Val His Ser Gly Tyr Ser Ser Glu		
275	280	285
Met Val Asn Ser Gly Tyr Leu His Val Asn Pro Met Gln Gln Val Asn		
290	295	300
Thr Ser Ser Asp Pro Leu Ser Cys Phe Asn Asn Gly Glu Ala Pro Ser		
305	310	315
Met Trp Asp Ser His Val Gln Asn Leu Tyr Gly Asn Leu Gly Val		
325	330	335

<210> 94

<211> 533

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 94

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

35	40	45
Lys Leu Glu Gln Leu Glu Val Met Met Ser Asn Val Gln Glu Asp Asp		
50	55	60
Leu Ser Gln Leu Ala Thr Glu Thr Val His Tyr Asn Pro Ala Glu Leu		
65	70	75
Tyr Thr Trp Leu Asp Ser Met Leu Thr Asp Leu Asn Pro Pro Ser Ser		
85	90	95
Asn Ala Glu Tyr Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asp Ala Ile Leu Asn		
100	105	110
Gln Phe Ala Ile Asp Ser Ala Ser Ser Ser Asn Gln Gly Gly Gly Gly		
115	120	125
Asp Thr Tyr Thr Thr Asn Lys Arg Leu Lys Cys Ser Asn Gly Val Val		
130	135	140
Glu Thr Thr Thr Ala Thr Ala Glu Ser Thr Arg His Val Val Leu Val		
145	150	155
Asp Ser Gln Glu Asn Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys		
165	170	175
Ala Glu Ala Val Gln Lys Glu Asn Leu Thr Val Ala Glu Ala Leu Val		
180	185	190
Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser Gln Ile Gly Ala Met Arg Lys		
195	200	205
Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Leu		
210	215	220
Ser Pro Ser Gln Ser Pro Ile Asp His Ser Leu Ser Asp Thr Leu Gln		
225	230	235
Met His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr		
245	250	255
Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Gln Gly Lys Lys Arg Val His		
260	265	270
Val Ile Asp Phe Ser Met Ser Gln Gly Leu Gln Trp Pro Ala Leu Met		
275	280	285
Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Val Phe Arg Leu Thr		
290	295	300
Gly Ile Gly Pro Pro Ala Pro Asp Asn Phe Asp Tyr Leu His Glu Val		
305	310	315
Gly Cys Lys Leu Ala His Leu Ala Glu Ala Ile His Val Glu Phe Glu		
325	330	335
Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Thr Leu Ala Asp Leu Asp Ala Ser Met		
340	345	350

Leu Glu Leu Arg Pro Ser Glu Ile Glu Ser Val Ala Val Asn Ser Val
 355 360 365
 Phe Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg Pro Gly Ala Ile Asp Lys Val
 370 375 380
 Leu Gly Val Val Asn Gln Ile Lys Pro Glu Ile Phe Thr Val Val Glu
 385 390 395 400
 Gln Glu Ser Asn His Asn Ser Pro Ile Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu
 405 410 415
 Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Val Pro
 420 425 430
 Ser Gly Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile
 435 440 445
 Cys Asn Val Val Ala Cys Asp Gly Pro Asp Arg Val Glu Arg His Glu
 450 455 460
 Thr Leu Ser Gln Trp Arg Asn Arg Phe Gly Ser Ala Gly Phe Ala Ala
 465 470 475 480
 Ala His Ile Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala
 485 490 495
 Leu Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg Val Glu Glu Ser Asp Gly Cys
 500 505 510
 Leu Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp
 515 520 525
 Lys Leu Ser Thr Asn
 530
 <210> 95
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 95
 Met Ala Ala Ser Asp Glu Val Asn Leu Ile Glu Ser Arg Thr Val Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Asn Thr Trp Val Leu Ile Ser Asn Phe Lys Val Ala Tyr Asn
 20 25 30
 Ile Leu Arg Arg Pro Asp Gly Thr Phe Asn Arg His Leu Ala Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Asp Arg Lys Val Thr Ala Asn Ala Asn Pro Val Asp Gly Val Phe
 50 55 60

Ser Phe Asp Val Leu Ile Asp Arg Arg Ile Asn Leu Leu Ser Arg Val
 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Ala Tyr Ala Asp Gln Glu Gln Pro Pro Ser Ile Leu Asp
 85 90 95
 Leu Glu Lys Pro Val Asp Gly Asp Ile Val Pro Val Ile Leu Phe Phe
 100 105 110
 His Gly Gly Ser Phe Ala His Ser Ser Ala Asn Ser Ala Ile Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Leu Cys Arg Arg Leu Val Gly Leu Cys Lys Cys Val Val Val Ser
 130 135 140
 Val Asn Tyr Arg Arg Ala Pro Glu Asn Pro Tyr Pro Cys Ala Tyr Asp
 145 150 155 160
 Asp Gly Trp Ile Ala Leu Asn Trp Val Asn Ser Arg Ser Trp Leu Lys
 165 170 175
 Ser Lys Lys Asp Ser Lys Val His Ile Phe Leu Ala Gly Asp Ser Ser
 180 185 190
 Gly Gly Asn Ile Ala His Asn Val Ala Leu Arg Ala Gly Glu Ser Gly
 195 200 205
 Ile Asp Val Leu Gly Asn Ile Leu Leu Asn Pro Met Phe Gly Gly Asn
 210 215 220
 Glu Arg Thr Glu Ser Glu Lys Ser Leu Asp Gly Lys Tyr Phe Val Thr
 225 230 235 240
 Val Arg Asp Arg Asp Trp Tyr Trp Lys Ala Phe Leu Pro Glu Gly Glu
 245 250 255
 Asp Arg Glu His Pro Ala Cys Asn Pro Phe Ser Pro Arg Gly Lys Ser
 260 265 270
 Leu Glu Gly Val Ser Phe Pro Lys Ser Leu Val Val Val Ala Gly Leu
 275 280 285
 Asp Leu Ile Arg Asp Trp Gln Leu Ala Tyr Ala Glu Gly Leu Lys Lys
 290 295 300
 Ala Gly Gln Glu Val Lys Leu Met His Leu Glu Lys Ala Thr Val Gly
 305 310 315 320
 Phe Tyr Leu Leu Pro Asn Asn Asn His Phe His Asn Val Met Asp Glu
 325 330 335
 Ile Ser Ala Phe Val Asn Ala Glu Cys
 340 345

<210> 96

<211> 358

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 96

```

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

```

275	280	285
Asp Leu Val Gln Asp Trp Gln Leu Ala Tyr Val Asp Gly Leu Lys Lys		
290	295	300
Thr Gly Leu Glu Val Asn Leu Leu Tyr Leu Lys Gln Ala Thr Ile Gly		
305	310	315
Phe Tyr Phe Leu Pro Asn Asn Asp His Phe His Cys Leu Met Glu Glu		
325	330	335
Leu Asn Lys Phe Val His Ser Ile Glu Asp Ser Gln Ser Lys Ser Ser		
340	345	350
Pro Val Leu Leu Thr Pro		
355		
<210> 97		
<211> 344		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 97		
Met Ala Gly Ser Glu Glu Val Asn Leu Ile Glu Ser Lys Thr Val Val		
1	5	10
Pro Leu Asn Thr Trp Val Leu Ile Ser Asn Phe Lys Leu Ala Tyr Asn		
20	25	30
Leu Leu Arg Arg Pro Asp Gly Thr Phe Asn Arg His Leu Ala Glu Phe		
35	40	45
Leu Asp Arg Lys Val Pro Ala Asn Ala Asn Pro Val Asn Gly Val Phe		
50	55	60
Ser Phe Asp Val Ile Ile Asp Arg Gln Thr Asn Leu Leu Ser Arg Val		
65	70	75
Tyr Arg Pro Ala Asp Ala Gly Thr Ser Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gln		
85	90	95
Asn Pro Val Asp Gly Glu Ile Val Pro Val Ile Val Phe Phe His Gly		
100	105	110
Gly Ser Phe Ala His Ser Ser Ala Asn Ser Ala Ile Tyr Asp Thr Leu		
115	120	125
Cys Arg Arg Leu Val Gly Leu Cys Gly Ala Val Val Val Ser Val Asn		
130	135	140
Tyr Arg Arg Ala Pro Glu Asn Arg Tyr Pro Cys Ala Tyr Asp Asp Gly		
145	150	155
Trp Ala Val Leu Lys Trp Val Asn Ser Ser Ser Trp Leu Arg Ser Lys		

165 170 175
 Lys Asp Ser Lys Val Arg Ile Phe Leu Ala Gly Asp Ser Ser Gly Gly
 180 185 190
 Asn Ile Val His Asn Val Ala Val Arg Ala Val Glu Ser Arg Ile Asp
 195 200 205
 Val Leu Gly Asn Ile Leu Leu Asn Pro Met Phe Gly Gly Thr Glu Arg
 210 215 220
 Thr Glu Ser Glu Lys Arg Leu Asp Gly Lys Tyr Phe Val Thr Val Arg
 225 230 235 240
 Asp Arg Asp Trp Tyr Trp Arg Ala Phe Leu Pro Glu Gly Glu Asp Arg
 245 250 255
 Glu His Pro Ala Cys Ser Pro Phe Gly Pro Arg Ser Lys Ser Leu Glu
 260 265 270
 Gly Leu Ser Phe Pro Lys Ser Leu Val Val Val Ala Gly Leu Asp Leu
 275 280 285
 Ile Gln Asp Trp Gln Leu Lys Tyr Ala Glu Gly Leu Lys Lys Ala Gly
 290 295 300
 Gln Glu Val Lys Leu Leu Tyr Leu Glu Gln Ala Thr Ile Gly Phe Tyr
 305 310 315 320
 Leu Leu Pro Asn Asn Asn His Phe His Thr Val Met Asp Glu Ile Ala
 325 330 335
 Ala Phe Val Asn Ala Glu Cys Gln
 340
 <210> 98
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 98
 Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
 20 25 30
 Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
 35 40 45
 Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
 50 55 60
 Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg

65		70		75		80									
Lys	Gln	Arg	Ile	Thr	Glu	Thr	Glu	Ser	Pro	Tyr	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly
				85				90						95	
Gln	Arg	Ser	Asp	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Thr	Gln	Arg	Pro	Tyr	Tyr
			100					105						110	

Lys

<210> 99

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 99

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

<210> 100

<211> 102

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 100

Met	Gly	Gly	Leu	Glu	Pro	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu
1			5					10					15		
Leu	Ala	Val	Ser	Asp	Cys	Ser	Cys	Ser	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Val	Leu
			20					25					30		
Ala	Gly	Ile	Val	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ile	Ala	Leu

	35		40		45														
	Ala	Val	Tyr	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Arg	Gly	Ala	Ala			
	50						55					60							
	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg	Lys	Gln	Arg	Ile	Thr	Glu	Thr	Glu	Ser	Pro	Tyr			
	65					70					75				80				
	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Gln	Arg	Ser	Asp	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Thr			
				85					90					95					
	Gln	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Lys													
				100															

<210> 101

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 101

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

<210> 102

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 102

	Glu	Ser	Pro	Tyr	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Gln	Arg	Ser	Asp	Val	Tyr	Ser			
1				5					10					15					

Asp Leu Asn Thr Gln
20

<210> 103

<211> 86

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 103

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu 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 Ile 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 Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val
 50 55 60
Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
65 70 75 80
His Glu Lys Pro Pro Gln
 85

<210> 104

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 104

Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu
1 5 10 15
Thr Leu Lys His Glu
 20

<210> 105

<211> 171

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 105

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

<210> 106

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 106

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

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Thr Ala Asp Thr Gln
 85 90 95
 Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
 100 105 110
 Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
 115 120 125
 <210> 107
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 107
 Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser
 1 5 10 15
 His Leu Gly Gly Asn
 20
 <210> 108
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 108
 Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30
 Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45
 Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60
 Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80
 His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95
 Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110
 Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met

115	120	125
Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu		
130	135	140
Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys		
145	150	155
Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn		
165	170	175
Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg		
180	185	190
Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile		
195	200	205
<210> 109		
<211> 21		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 109		
Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser		
1	5	10
Gly Leu Asn Gln Arg		
20		
<210> 110		
<211> 182		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 110		
Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu		
1	5	10
Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys		
20	25	30
Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala		
35	40	45
Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe		
50	55	60
Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp		
65	70	75
		80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95
Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110
Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125
Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140
Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160
Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175
Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 111

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 111

Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser
1 5 10 15
His Leu Gln Gly Asn
20

<210> 112

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 112

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

50	55	60
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
65	70	75
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		80
	85	90
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		95
	100	105
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		110
	115	120
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		125
	130	135
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		140
145	150	155
160		
Pro Pro Arg		
<210> 113		
<211> 164		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 113		
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu		
1	5	10
Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys		15
	20	25
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala		30
	35	40
Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		45
	50	55
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		60
65	70	75
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		80
	85	90
Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		95
	100	105
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		110
	115	120
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		125
	130	135
		140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 114

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 114

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
1 5 10 15

Val Leu Asp Lys Arg
20

<210> 115

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 115

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
1 5 10 15

Ser Glu Ile Gly Met Lys
20

<210> 116

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 116

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
1 5 10 15

Ala Leu His Met Gln
20

<210> 117

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 117

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
20 25 30

Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu
35 40 45

Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val
50 55 60

Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val
85 90 95

Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn
100 105 110

Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro
115 120 125

Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile
130 135 140

Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly
145 150 155 160

Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu
165 170 175

Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
180 185 190

Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly
195 200 205

Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu
210 215 220

Lys Pro

225

<210> 118

<211> 188

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 118

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

<210> 119

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 119

Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu
 1 5 10 15
 Asp Ile Ser Arg Gly
 20

<210> 120

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 120

Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met
 1 5 10 15
 Pro Gly Arg Gly
 20

<210> 121

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 121

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

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 122

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 123

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 123
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
<210> 124
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 124
His His His His His
1 5
<210> 125
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 125
His His His His His His
1 5
<210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 126
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5
<210> 127
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 127

Arg Tyr Ile Arg Ser

1 5

<210> 128

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 128

Phe His His Thr

1

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 129

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg

1 5 10 15

Ala

<210> 130

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (3)

<223> 这些位置的氨基酸可以是任何氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> 该位置的氨基酸可以是Leu或Ile

<400> 130

Tyr Xaa Xaa Xaa

1

<210> 131

<211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (3)
 <223> 这些位置的氨基酸可以是任何氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4) .. (4)
 <223> 该位置的氨基酸可以是Leu或Ile
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5) .. (10)
 <223> 这些位置的氨基酸可以是任何氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11) .. (12)
 <223> 这些位置的氨基酸可以存在或不存在,使得一个或两个氨基酸存在。这些位置的氨基酸可以是任何氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (15)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (16)
 <223> 该位置的氨基酸可以是 Leu或Ile
 <400> 131
 Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 <210> 132
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多核苷酸

<400> 132

gattacaagg atgacgatga caag 24

<210> 133

<211> 732

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 133

Gly Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys

1 5 10 15

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys

20 25 30

Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr

35 40 45

Gly Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala

50 55 60

Thr Ala Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys

65 70 75 80

Thr Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Cys Ala Thr Thr Cys Ala Cys Thr

85 90 95

Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr

100 105 110

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala

115 120 125

Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Thr Thr Gly Ala Gly

130 135 140

Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala

145 150 155 160

Cys Thr Cys Cys Thr Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Cys

165 170 175

Thr Thr Cys Thr Ala Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly

180 185 190

Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Gly Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly

195 200 205

Cys Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Thr Gly Thr Ala Gly Ala

210 215 220

Cys Ala Ala Gly Thr Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala

225 230 235 240

Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Cys Thr Cys Cys
 245 250 255
 Thr Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala
 260 265 270
 Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Ala Thr
 275 280 285
 Thr Thr Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 290 295 300
 Gly Thr Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Thr Thr Thr Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys
 325 330 335
 Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys Ala
 340 345 350
 Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly
 355 360 365
 Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys
 370 375 380
 Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys Thr Ala Gly Cys Gly Gly Thr Gly
 385 390 395 400
 Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Gly Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Ala
 405 410 415
 Gly Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala
 420 425 430
 Gly Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr
 435 440 445
 Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Thr
 450 455 460
 Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr
 465 470 475 480
 Gly Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala
 485 490 495
 Gly Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala
 500 505 510
 Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr Cys Ala Gly Gly Cys
 515 520 525
 Ala Cys Cys Thr Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Ala Gly Ala Thr
 530 535 540
 Gly Gly Ala Thr Thr Thr Ala Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys

545 550 555 560
 Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala
 565 570 575
 Gly Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala
 580 585 590
 Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly
 595 600 605
 Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys
 610 615 620
 Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Gly Thr Gly Gly
 625 630 635 640
 Ala Gly Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Cys
 645 650 655
 Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly
 660 665 670
 Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Ala Ala Gly Cys Ala Cys Cys
 675 680 685
 Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Gly Thr Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys
 690 695 700
 Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Ala Ala
 705 710 715 720
 Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr Ala Gly Cys
 725 730
 <210> 134
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 134
 Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln
 50 55 60
 Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr

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

<210> 135

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 135

```

ggatcccagg tgcagctgca ggaatctggc cctggcctcg tgaagcccag cgagacactg 60
agcctgacct gtaccgtgtc tggcggctct gtgtccagcg gcagctacta ctggctctgg 120
atcagacagc cccctggcaa gggcctggaa tggatcggtt acatctacta cagcggctcc 180
accactaca accccagcct gaagtccaga gtgaccatca gcgtggacac cagcaagaac 240
cagttctccc tgaagctgag cagcgtgaca gccgccgata ccgccgtgta ctactgtgcc 300
agagagggca agaacggcgc cttcgacatc tggggccagg gcacaatggt caccgtgtca 360
tctggtggag gaggatctgg gggaggcgga agcggaggcg gcggatctga tattcagatg 420
accagagacc ccagcagcct gagcgcctct gtgggcgaca gactgacaat tacctgccgg 480
gccagccaga gcatcagcag ctacctgaac tggtatcagc agaagcccgg caaggcccc 540
aaactgctga tctacgccgc cagctctctg cagtctggcg tgcccagcag attttccggc 600

```

tctggcagcg gcaccgactt caccctgacc atctctagcc tgcagcccga ggacttcgcc 660
 acctactact gccagcagag ctacagcacc ccctgacct ttggcggagg caccaagtg 720
 gaaatcaag 729

<210> 136

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 136

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

225	230	235	240
Glu Ile Lys			
<210> 137			
<211> 1044			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多核苷酸			
<400> 137			
atggctgcga gcgatgaagt taatcttatt gagagcagaa cagtggttcc tctcaataca 60			
tgggttttaa tatccaactt caaagtagcc tacaatatec ttcgtcgcc tgatggaacc 120			
tttaaccgac acttagctga gtatctagac cgtaaagtea ctgcaaacgc caatccggtt 180			
gatggggttt tctcgttcga tgtcttgatt gatcgcagga tcaatcttct aagcagagtc 240			
tatagaccag cttatgcaga tcaagagcaa cctcctagta ttttagatct cgagaagcct 300			
gttgatggcg acattgtccc tgttatattg ttcttccatg gaggtagctt tgctcattct 360			
tctgcaaaca gtgcatctca cgatactctt tgtcgcaggc ttgttggttt gtgcaagtgt 420			
gttggtgtct ctgtgaatta tcggcgtgca ccagagaatc catacccttg tgcttatgat 480			
gatggttgga ttgctcttaa ttgggttaac tcgagatctt ggcttaaate caagaaagac 540			
tcaaaggctc atattttctt ggctggtgat agctctggag gtaacatcgc gcataatgtg 600			
gctttaagag cgggtgaate gggaatcgat gttttgggga acattctgct gaatcctatg 660			
tttggtgagg atgagagaac ggagtctgag aaaagtttgg atgggaaata ctttgtgacg 720			
gtagagacc gcgattggtg ctggaaagcg tttttaccgg agggagaaga tagagagcat 780			
ccagcgtgta atccgtttag cccgagaggg aaaagcttag aaggagtgag tttccccaag 840			
agtcttgtgg ttgtcgcggg tttggatttg attagagatt ggcagttggc atacgcggaa 900			
gggctcaaga aagcgggtca agaggttaag cttatgcatt tagagaaagc aactgttggg 960			
ttttacctct tgcctaataa caatcatttc cataatgtaa tggatgagat ttcggcgttt 1020			
gtaaacgcgg aatgtatgcg tgac 1044			
<210> 138			
<211> 348			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 138			
Met Ala Ala Ser Asp Glu Val Asn Leu Ile Glu Ser Arg Thr Val Val			
1 5 10 15			
Pro Leu Asn Thr Trp Val Leu Ile Ser Asn Phe Lys Val Ala Tyr Asn			
20 25 30			
Ile Leu Arg Arg Pro Asp Gly Thr Phe Asn Arg His Leu Ala Glu Tyr			

35	40	45
Leu Asp Arg Lys Val Thr Ala Asn Ala Asn Pro Val Asp Gly Val Phe		
50	55	60
Ser Phe Asp Val Leu Ile Asp Arg Arg Ile Asn Leu Leu Ser Arg Val		
65	70	75
Tyr Arg Pro Ala Tyr Ala Asp Gln Glu Gln Pro Pro Ser Ile Leu Asp		
85	90	95
Leu Glu Lys Pro Val Asp Gly Asp Ile Val Pro Val Ile Leu Phe Phe		
100	105	110
His Gly Gly Ser Phe Ala His Ser Ser Ala Asn Ser Ala Ile Tyr Asp		
115	120	125
Thr Leu Cys Arg Arg Leu Val Gly Leu Cys Lys Cys Val Val Val Ser		
130	135	140
Val Asn Tyr Arg Arg Ala Pro Glu Asn Pro Tyr Pro Cys Ala Tyr Asp		
145	150	155
Asp Gly Trp Ile Ala Leu Asn Trp Val Asn Ser Arg Ser Trp Leu Lys		
165	170	175
Ser Lys Lys Asp Ser Lys Val His Ile Phe Leu Ala Gly Asp Ser Ser		
180	185	190
Gly Gly Asn Ile Ala His Asn Val Ala Leu Arg Ala Gly Glu Ser Gly		
195	200	205
Ile Asp Val Leu Gly Asn Ile Leu Leu Asn Pro Met Phe Gly Gly Asn		
210	215	220
Glu Arg Thr Glu Ser Glu Lys Ser Leu Asp Gly Lys Tyr Phe Val Thr		
225	230	235
Val Arg Asp Arg Asp Trp Tyr Trp Lys Ala Phe Leu Pro Glu Gly Glu		
245	250	255
Asp Arg Glu His Pro Ala Cys Asn Pro Phe Ser Pro Arg Gly Lys Ser		
260	265	270
Leu Glu Gly Val Ser Phe Pro Lys Ser Leu Val Val Val Ala Gly Leu		
275	280	285
Asp Leu Ile Arg Asp Trp Gln Leu Ala Tyr Ala Glu Gly Leu Lys Lys		
290	295	300
Ala Gly Gln Glu Val Lys Leu Met His Leu Glu Lys Ala Thr Val Gly		
305	310	315
Phe Tyr Leu Leu Pro Asn Asn Asn His Phe His Asn Val Met Asp Glu		
325	330	335
Ile Ser Ala Phe Val Asn Ala Glu Cys Met Arg Asp		
340	345	

<210> 139

<211> 276

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 139

atgaagagag atcatcatca tcatcatcat caagataaga agactatgat gatgaatgaa 60
 gaagacgacg gtaacggcat ggatgagctt ctagctgttc ttggttaciaa ggtaggtca 120
 tccgaaatgg ctgatgttgc tcagaaactc gagcagcttg aagttatgat gtctaattgtt 180
 caagaagacg atctttctca actcgtact gagactgttc actataatcc ggcggagctt 240
 tacacgtggc ttgattctat gtcaccgac cttaat 276

<210> 140

<211> 92

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 140

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

<210> 141

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 141

ggatcccagg tgcagctggt gcagtctggc gccgaagtga aaagaccagg cgccagcgtg 60

caggtctcct gtagagccag cggctacagc atcaacacct actacatgca gtgggtgcgc 120
 caggccccag gcgctggact ggaatggatg ggcgatgca accccagcgg cgtgacaagc 180
 tacgcccaga aattccaggg cagagtgacc ctgaccaacg acaccagcac caacacagtg 240
 tacatgcagc tgaacagcct gaccagcgcg gacaccgccg tgtactactg tgccagatgg 300
 gccctgtggg gcgacttcgg catggatgtg tggggcaagg gcaccctcgt gaccgtgtct 360
 agcggaggcg gaggatctgg cggaggggga tctggaggcg gcggaagcga catccagatg 420
 acccagagcc ctagcaccct gagcgcagc atcggcgata gagtgacat cacctgtcgg 480
 gccagcgagg gcatctatca ctggctggcc tggtatcagc agaagcccgg caaggcccc 540
 aagctgctga tctacaaggc cagctctctg gcctctggcg cccctagcag attttctggc 600
 agcggctccg gcaccgactt cacctgaca atcagcagc tgcagcccga cgacttcgcc 660
 acctactatt gccagcagta cagcaactac ccctgacct tcggcggagg caccaagctg 720
 gaaatcaag 729

<210> 142

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 142

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

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

Glu Ile Lys

<210> 143

<211> 135

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 143

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60
 tccttgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
 gacttgcct gtgat 135

<210> 144

<211> 204

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 144

ttttgggtgc tggtggtggt tggaggagtc ctggcttget atagcttgct agtaacagtg 60
 gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tctgcacag tgactacatg 120
 aacatgactc cccgccgcc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 180
 cgcgacttcg cagcctatcg ctcc 204

<210> 145

<211> 111

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 145

cggagggacc agaggctgcc ccccgatgcc cacaagcccc ctgggggagg cagtttccgg 60
accccatcc aagaggagca ggccgacgcc cactccaccc tggccaagat c 111

图1A和图1B.构建体#122,编码包含“抗-CD19 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域 - FKBP”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)

MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Myc表位标记:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG (SEQ ID NO:3)

EQKLISEEDL (SEQ ID NO:4)

抗人CD19 scFv:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA
GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAACTCCT
GATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT
TATTCCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGC
TTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGT
GGGTGGCGGGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG
TCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCAC
GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATC
CAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGAT
GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD
YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSL
SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNLSALKSRLTIKDNSKQVFLKMNSLQTD
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO:6)

图1A

人CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC
(SEQ ID NO:7)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYC (SEQ ID NO:8)

接头:

TCCCTAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:9)
SLGSGSGSGS (SEQ ID NO:10)

FKBP:

ATGGGAGTcCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCG
TGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTT
TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGT
CAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCAC
CACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGGAA (SEQ ID NO:11)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDNRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVG
QRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE (SEQ ID NO:12)

图1B

图2A和图2B. 构建体#123, 编码包含“FRB - CD3 ζ 胞内链- mCherry”的多肽

FRB:

ATGATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGA
ACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAA
GGAAACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATG
AAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCGACGAATCTCAA
AG (SEQ ID NO:13)

MILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYM
KSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISK (SEQ ID NO:14)

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)

GSGSGSSSL (SEQ ID NO:16)

人CD3 ζ 胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCCGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
NO:17)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:18)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

图2A

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCG
AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
GAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGC
TGTAACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF
MYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTFNFPDGPV
MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN
EDYTIVEQYERAEGRHSTGG
MDELYK (SEQ ID NO:22)

图2B

图3A和图3B.构建体#125,编码包含“抗-CD19 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域 - 4-1BB & CD3 ζ 胞内链”的常规CAR

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Myc 表位标记:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG (SEQ ID NO:3)
EQKLISEEDL (SEQ ID NO:4)

抗人CD19 scFv:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA
GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTAAACTCCT
GATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT
TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGC
TTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC
GGGTGGCGCGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG
TCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTTCGCCAGCCTCCAC
GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATC
CAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGAT
GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD
YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSL
SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVGIWGSETTYNSALKSRLLTIKDNSKSKVFLKMNSLQTD
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:6)

图3A

人 CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCGAGCCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC
(SEQ ID NO:7)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
(SEQ ID NO:8)

接头:

TCCCTA

SerLeu

人 4-1BB 胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

人 CD3 ζ 胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCtCCTCGC (SEQ ID
NO:25)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:26)

图3B

构建体 #126, 编码融合蛋白“FRB - mCherry”

FRB:

ATGATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGA
ACGTGAAAGGCATGTTTGGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAA
GGAAACATCCTTTAATCAGGCCATATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATG
AAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCCGACGAATCTCAA
AG (SEQ ID NO:13)

MILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYM
KSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO:14)

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)
GSGSGSSSL (SEQ ID NO:16)

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCG
AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
GAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGC
TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF
MYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTFNFPDGPV
MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN
EDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID NO:22)

图4

图 5A 和图 5B。构建体 #168, 编码包含“DAP10 胞外结构域- CD8 α 跨膜结构域 - FRB - CD3 ζ 胞内链- mCherry”的多肽

人 DAP10 信号序列和胞外结构域:

Atgatccatctgggtcacatcctcttctctgcttttgcctcccagtggtgcagctcagacgaactccaggag
agagatcatcactccctgccttttaccctggcaacttcaggctcttggtccggatgtgggtccctctctct
gccg (SEQ ID NO:27)

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO:28)

人 CD8 α 跨膜结构域:

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACT
GC (SEQ ID NO:29)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:30)

接头:

GGtTCCGGcAGCGGaTCTGGtAGcGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:31)

GSgSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:32)

FRB:

ATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACG
TGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCAGACTCTGAAGGA
AACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAA
TCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCGACGAATCTCAAAG
(SEQ ID NO:33)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMK
SGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO:34)

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)

GSgSGSGSSL (SEQ ID NO:16)

图5A

人CD3 胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
 TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG
 AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
 TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
 GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
 NO:17)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKGHGDLGQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:18)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
 AGGGCTCCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
 GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
 ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCG
 AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
 CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
 ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
 GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
 GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCACAAC
 GAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGC
 TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF
 MYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPV
 MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN
 EDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID NO:22)

图5B

图6A至图6C。构建体#169, 编码包含“DAP10胞外结构域- CD8 α 跨膜结构域 - FRB - 4-1BB & CD3 ζ 胞内链- mCherry”的多肽

人DAP10信号序列和胞外结构域:

Atgatccatctgggtcacatcctcttctgcttttgcctcccagtggtgcagctcagacgactccaggag
agagatcatcactccctgccttttaccctggcacttcaggctcttgttccggatgtgggtccctctctct
gccg (SEQ ID NO:27)
MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO:28)

人CD8 α 跨膜结构域

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACCTGGTTATCACCCCTTACT
GC (SEQ ID NO:29)
IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:30)

接头:

GGtTCCGGcAGCGGAtCTGGtAGcGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:31)
GSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:32)

FRB:

ATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAAGGAACG
TGAAAGGCATGTTTGGAGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA
AACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGAGAGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAA
TCAGGGAATGTCAAGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTCCGACGAATCTCAAAG
(SEQ ID NO:33)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMK
SGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISK (SEQ ID NO:34)

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTCCCTA (SEQ ID NO:15)
GSGSGSGSSL (SEQ ID NO:16)

图6A

人4-1BB胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)

KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

人CD3胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCCGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
NO:17)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:18)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

图6B

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
GACCCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCG
AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCACAAC
GAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGC
TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF
MYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPV
MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN
EDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID NO:22)

图6C

图7A和图7B. 构建体#170, 编码包含“DAP10胞外结构域- CD8 α 跨膜结构域- FRB - mCherry”的多肽

人DAP10信号序列和胞外结构域:

Atgatccatctgggtcacatcctcttctctgcttttgcctcccagtggtgcagctcagacgactccaggag
agagatcatcactccctgccttttaccctggcacttcaggctcttgttccggatgtgggtccctctctct
gccg (SEQ ID NO:27)

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO:28)

人CD8 α 跨膜结构域:

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACT
GC (SEQ ID NO:29)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:30)

接头:

GGtTCCGGcAGCGGaTCTGGtAGcGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:31)

SGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:32)

FRB:

ATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTGTACTTTGGGGAAAGGAACG
TGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA
AACATCCTTTAATCAGGCCATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAA
TCAGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTCCGACGAATCTCAAAG
(SEQ ID NO:33)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMK
SGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISK (SEQ ID NO:34)

图7A

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)

GSGSGSSSL (SEQ ID NO:16)

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCG
AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
ATGCAGAAGAAGCCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
GAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGC
TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF
MYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPV
MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN
EDYTIVEQYERAEGRHSTGMDELYK (SEQ ID NO:22)

图7B

图 8A 和图 8B.构建体 #197, 编码包含“抗-CD19 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域 - 4-1BB 胞内链 - FKBP”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Myc 表位标记:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG (SEQ ID NO:3)
EQKLISEEDL (SEQ ID NO:4)

抗人 CD19 scFv:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA
GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAAACTCCT
GATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGCTGGAACAGAT
TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGC
TTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC
GGGTGGCGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG
TCCGTACATGCACTGTCTCAGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTTCGCCAGCCTCCAC
GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATC
CAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGAT
GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGGTD
YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQL
SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:6)

图8A

人 CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGC
(SEQ ID NO:7)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
(SEQ ID NO:8)

接头:

TCCCTA
SerLeu

人 4-1BB 胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)
KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)
SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

FKBP:

ATGGGAGTcCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCC
TGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTT
TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCCAGATGAGTGTGGGT
CAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCAC
CACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGGAA (SEQ ID NO:11)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDNRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVG
QRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (SEQ ID NO:12)

图8B

图9A至图9C。构建体#206, 编码包含“DAP10胞外结构域- CD8 α 跨膜结构域- 4-1BB胞内链- FRB - CD3 ζ 胞内链- mCherry”的多肽

人DAP10信号序列和胞外结构域:

Atgatccatctgggtcacatcctcttctctgcttttgcctcccagtggtgcagctcagacgactccaggag
agagatcatcactccctgcctttaccctggcacttcaggctcttggtccggatgtgggtccctctctct
gccg (SEQ ID NO:27)
MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO:28)

人CD8 α 跨膜结构域:

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACT
GC (SEQ ID NO:29)
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:30)

接头:

Tctctg
SerLeu

人4-1BB胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)
KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

接头:

GGtTCCGGcAGCGGATCTGGtAGcGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:31)
GSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:32)

图9A

FRB:

ATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACG
 TGAAAGGCATGTTTGGAGTGTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA
 AACATCCTTTAATCAGGCCATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAA
 TCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCGACGAATCTCAAAG
 (SEQ ID NO:33)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMK
 SGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO:34)

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)

GS S G S G S S L (SEQ ID NO:16)

人CD3 ζ 胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
 TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGG
 AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
 TACAGTGAAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
 GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG (SEQ ID
 NO:17)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRKRGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:18)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SR S G S G S G S (SEQ ID NO:20)

图9B

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
 AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
 GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
 ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCG
 AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
 CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
 ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
 GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
 GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
 GAGGACTACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGC
 TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAI I KEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVKGGPLPFAWDILSPQF
 MYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIIYKVKLRGTFNFPDGPV
 MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN
 EDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID NO:22)

图9C

图10A和图10B。构建体#207, 编码包含“ DAP10胞外结构域- CD8 α 跨膜结构域 - 4-1BB胞内链- FRB - mCherry”的多肽

人 DAP10 信号序列和胞外结构域:

Atgatccatctgggtcacatcctcttcctgcttttgcctcccagtggtgcagctcagacgactccaggag
agagatcatcactccctgccttttaccctggcacttcaggctcttggtccggatgtgggtccctctctct
gccg (SEQ ID NO:27)
MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO:28)

人 CD8 α 跨膜结构域:

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACT
GC (SEQ ID NO:29)
IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:30)

接头:

Tctctg
SerLeu

人 4-1BB 胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

接头:

GGtTCCGGcAGCGGaTCTGGtAGcGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:31)
GSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:32)

图10A

FRB:

ATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACG
TGAAAGGCATGTTTGGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA
AACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAA
TCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTCCGACGAATCTCAAAG
(SEQ ID NO:33)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYM
SGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO:34)

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)
GSGSGSSSL (SEQ ID NO:16)

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCG
AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
GAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGC
TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVKTKGGPLP
FAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVVTQDSSLQD
GEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDA
EVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID
NO:22)

图10B

图11A至图11C.构建体#199,编码融合蛋白“FRB - Zap70 - mCherry”

FRB:

ATGATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGA
ACGTGAAAGGCATGTTTGGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAA
GGAAACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATG
AAATCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCGACGAATCTCAA
AG (SEQ ID NO:13)

MILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYM
KSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO:14)

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)
GSGSGSSSL (SEQ ID NO:16)

图11A

人 Zap70:

ATGCCAGACCCCGCGGCATCTGCCCTTCTTCTACGGCAGCATCTCGCGTGCCGAGGCCGAGGAGCACC
TGAAGCTGGCGGCATGGCGGACGGGCTCTTCTGCTGCGCCAGTGCCTGCGCTCGCTGGGCGGCTATGT
GCTGTGCTCGTGCACGATGTGCGCTTCCACCACTTTCCATCGAGCGCCAGCTCAACGGCACCTACGCC
ATTGCCGGCGGCAAAGCGCACTGTGGACCGGCAGAGCTCTGCGAGTTCTACTCGCGGACCCCGACGGGC
TGCCCTGCAACCTGCGCAAGCCGTGCAACCGGCCGTGGGCTCGAGCCGAGCCGGGGTCTTCGACTG
CCTGCGAGACGCCATGGTGCCTGACTACGTGCGCCAGACGTGGAAGCTGGAGGGCGAGGCCCTGGAGCAG
GCCATCATCAGCCAGGCCCCGCAAGTGGAGAAGCTCATTGCTACGACGGCCACGAGCGGATGCCCTGGT
ACCACAGCAGCCTGACGCGTGAGGAGGCCGAGCGCAAACCTTTACTCTGGGGCGCAGACCGACGGCAAGTT
CCTGCTGAGGCCGCGGAAGGAGCAGGGCACATACGCCCTGTCCCTCATCTATGGGAAGACGGTGTACCAC
TACCTCATCAGCCAAGACAAGCGGGCAAGTACTGCATTCCCGAGGGCACCAGTTTGACACGCTCTGGC
AGCTGGTGGAGTATCTGAAGCTGAAGGCGGACGGGCTCATCTACTGCCTGAAGGAGGCCTGCCCAACAG
CAGTGCCAGCAACGCCTCAGGGGCTGCTGCTCCACACTCCAGCCACCCATCCACGTTGACTCATCCT
CAGAGACGAATCGACACCCCAACTCAGATGGATACACCCCTGAGCCAGCACGCATAACGTCCCCAGACA
AACCGCGGCCGATGCCATGGACACGAGCGTGTATGAGAGCCCTACAGCGACCAGAGGAGCTCAAGGA
CAAGAAGCTCTTCTGAAGCGGATAACCTCCTCATAGCTGACATTGAACTTGCTGCGGCAACTTTGGC
TCAGTGCGCCAGGGCGTGTACCGCATGCGCAAGAAGCAGATCGACGTGGCCATCAAGGTGCTGAAGCAGG
GCACGGAGAAGGCAGACACGGAAGAGATGATGCGCGAGGGCGCAGATCATGCACCAGCTGGACAACCCCTA
CATCGTGCGGCTCATTTGGCGTCTGCCAGGCCGAGGCCCTCATGCTGGTCATGGAGATGGCTGGGGCGGG
CCGCTGCACAAGTTCTGGTCGGCAAGAGGGAGGAGATCCCTGTGAGCAATGTGGCCGAGCTGCTGCACC
AGGTGTCCATGGGGATGAAGTACCTGGAGGAGAAGAACTTTGTGCACCGTGACCTGGCGGCCCGCAACGT
CCTGCTGGTTAACGGCACTACGCCAAGATCAGCGACTTTGGCCTCTCCAAAGCACTGGGTGCCGACGAC
AGCTACTACACTGCCCGCTCAGCAGGGAAGTGGCCGCTCAAGTGGTACGCACCCGAATGCATCAACTTCC
GCAAGTTCTCCAGCCGACGATGTCTGGAGCTATGGGGTACCATGTGGGAGGCCTTGTCTACGGCCA
GAAGCCCTACAAGAAGATGAAAGGGCCGAGGTCATGGCCTTCATCGAGCAGGCAAGCGGATGGAGTGC
CCACCAGAGTGTCCACCCGAAGTGTACGCACTCATGAGTACTGCTGGATCTACAAGTGGGAGGATCGCC
CCGACTTCTGACCGTGGAGCAGCGCATGCGAGCCTGTTACTACAGCCTGGCCAGCAAGGTGGAAGGGCC
CCCAGGCAGCACACAGAAGGCTGAGGCTGCCTGTGCC (SEQ ID NO:35)

MPDPAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYA
IAGGKAHCGPAELCFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTKLEGEALEQ
AIIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGKFLLRPRKEQGTYSLSLIYGKTVYH
YLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKLDGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAHPSTLTHP
QRRIDTLNSDGYTPEPARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFLKRDNLLIADIELGCGNFG
SVRQGVYRMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGG
PLHKFLVGKREEIPVSNVAELHQQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADD
SYYTARSAGKWPLKWAYPECINFRKFSSRSVWSYGVTMWEALSYGQKPYKMKGPEVMAFIEQGRMEC
PPECPELYALMSDCWIYKWE DRP DFLTVEQRMRACYISLASKVEGPPGSTQKAEAAACA (SEQ ID
NO:36)

图11B

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)
 SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
 AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
 GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
 ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCG
 AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
 CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
 ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
 GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
 GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
 GAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACGGCGGCATGGACGAGC
 TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF
 MYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPV
 MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN
 EDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID NO:22)

图11C

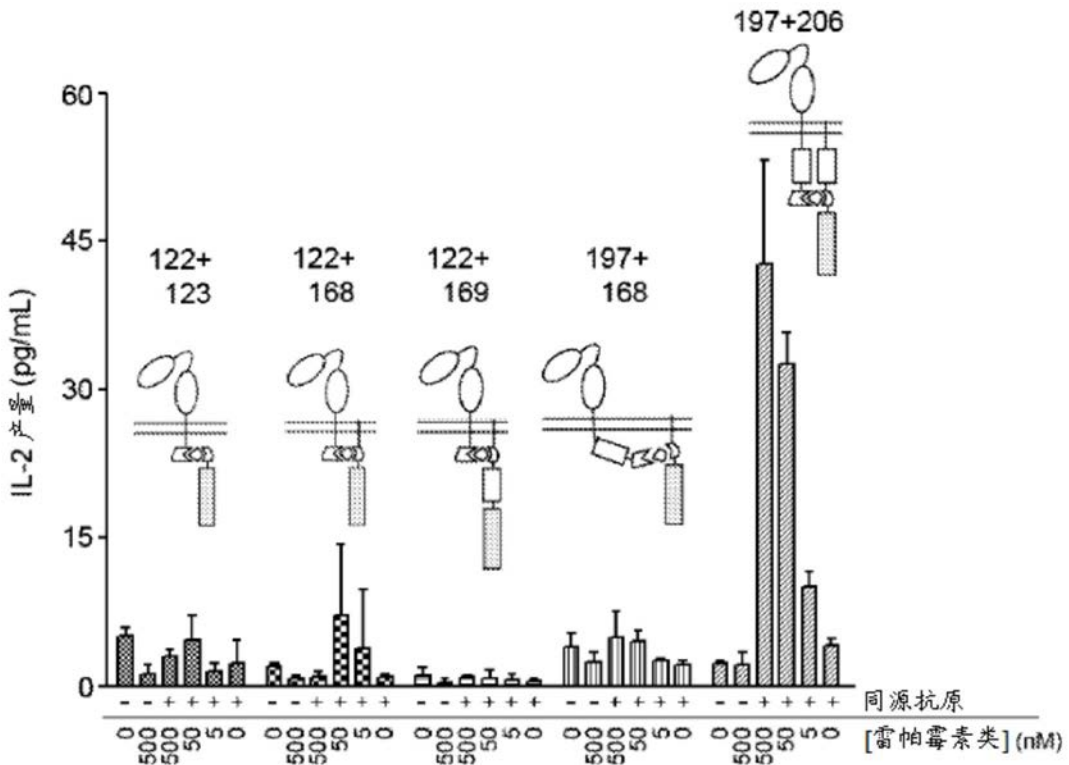


图12

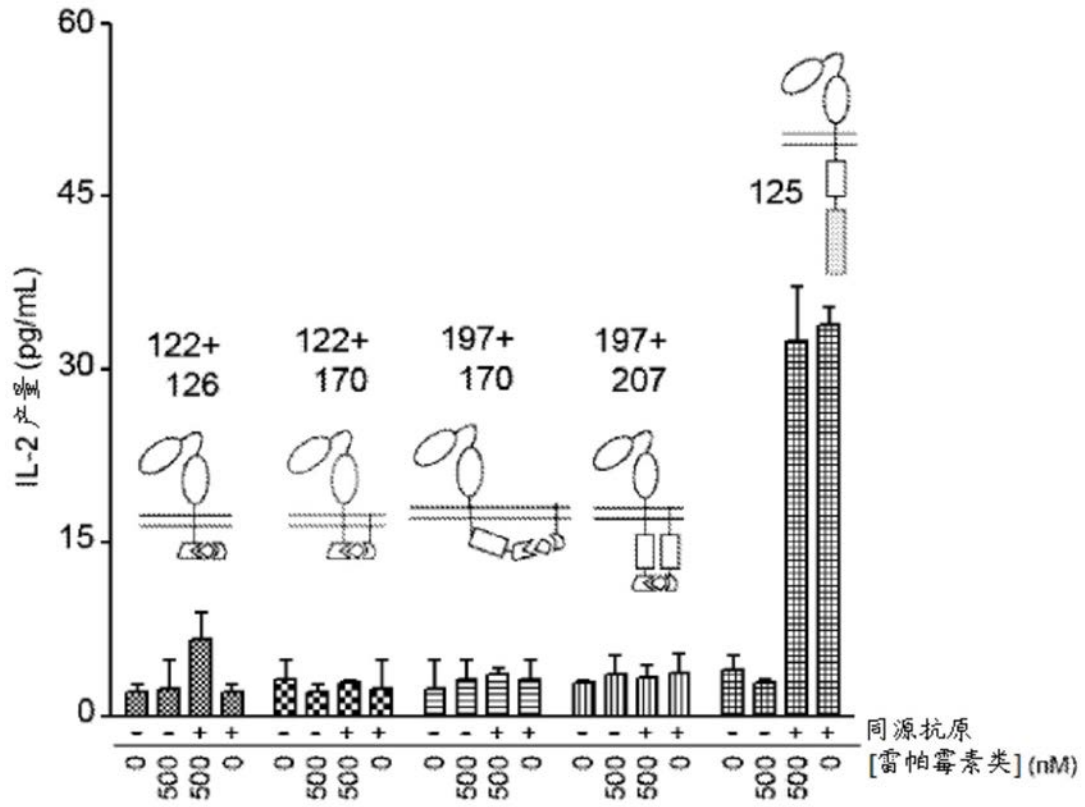


图13

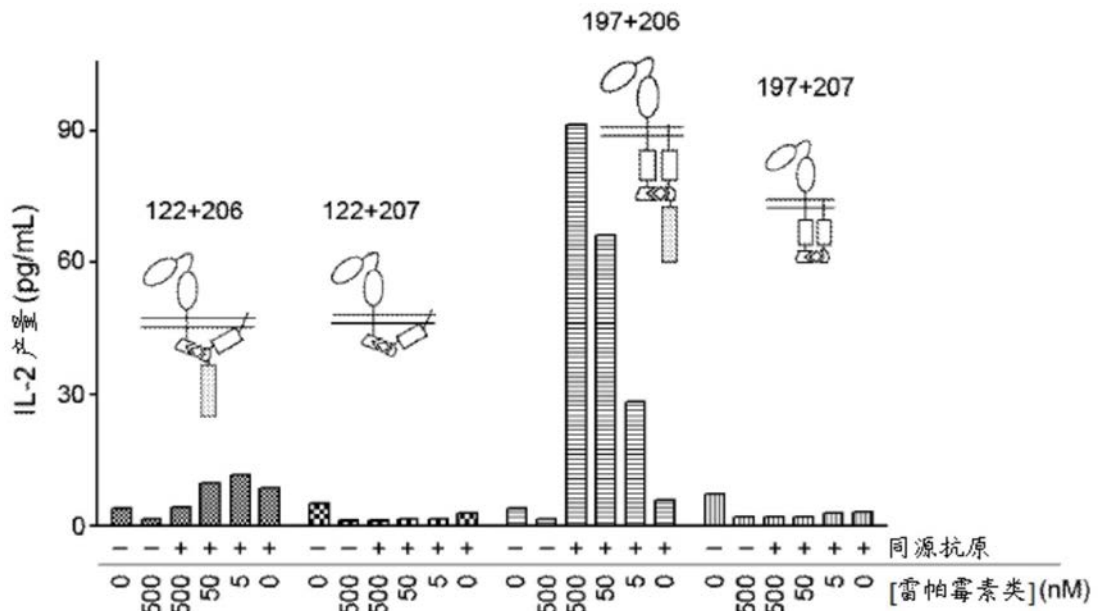


图14

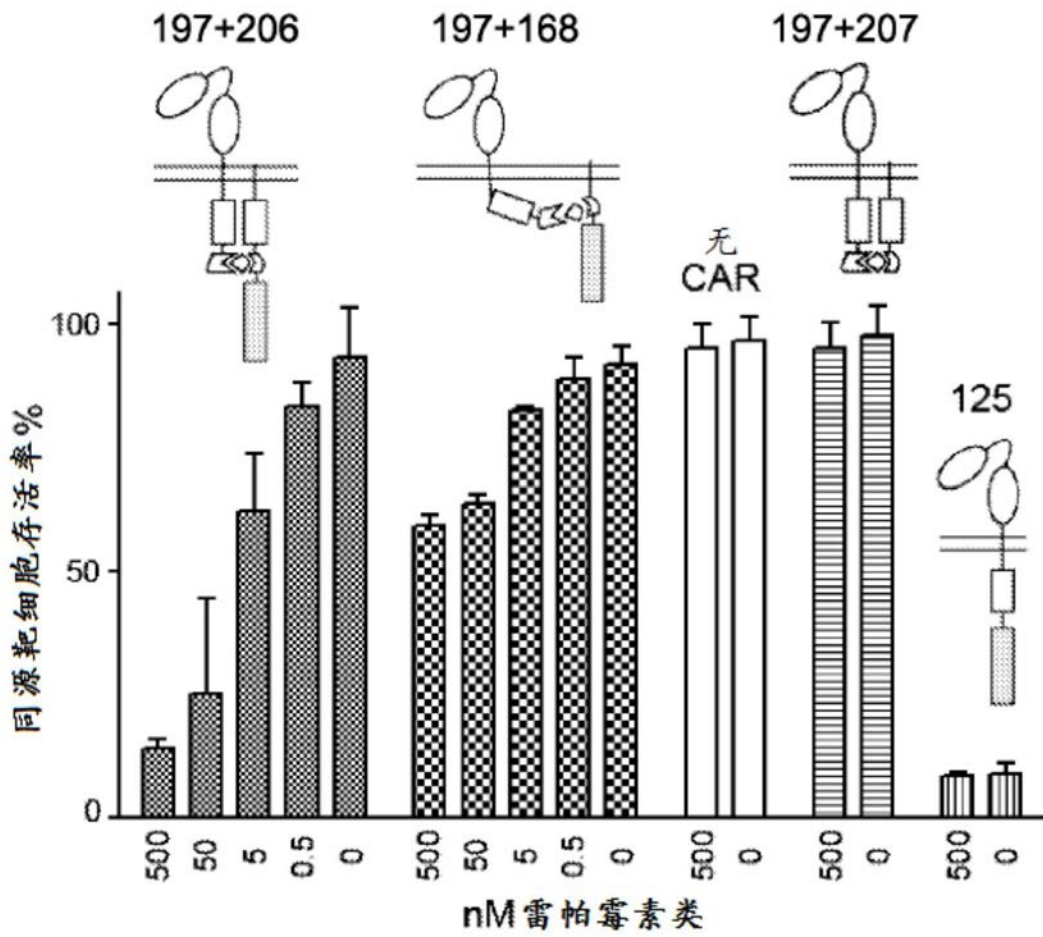


图15

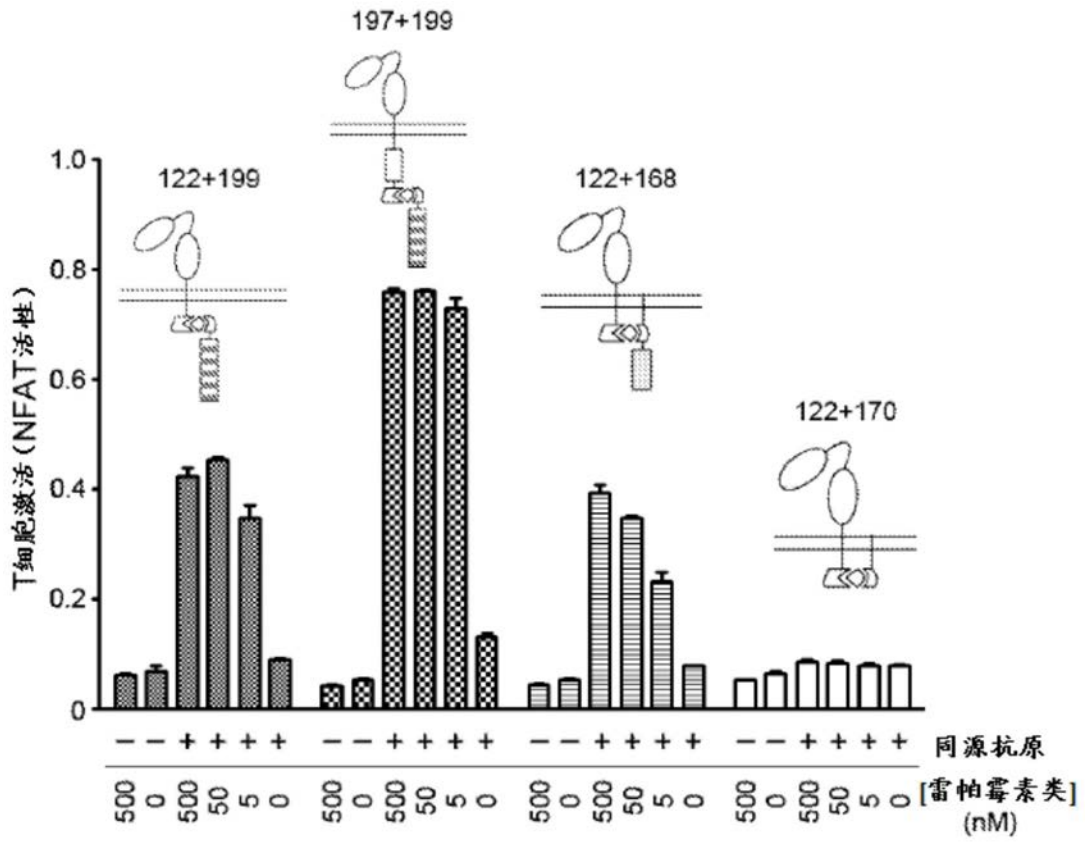


图16

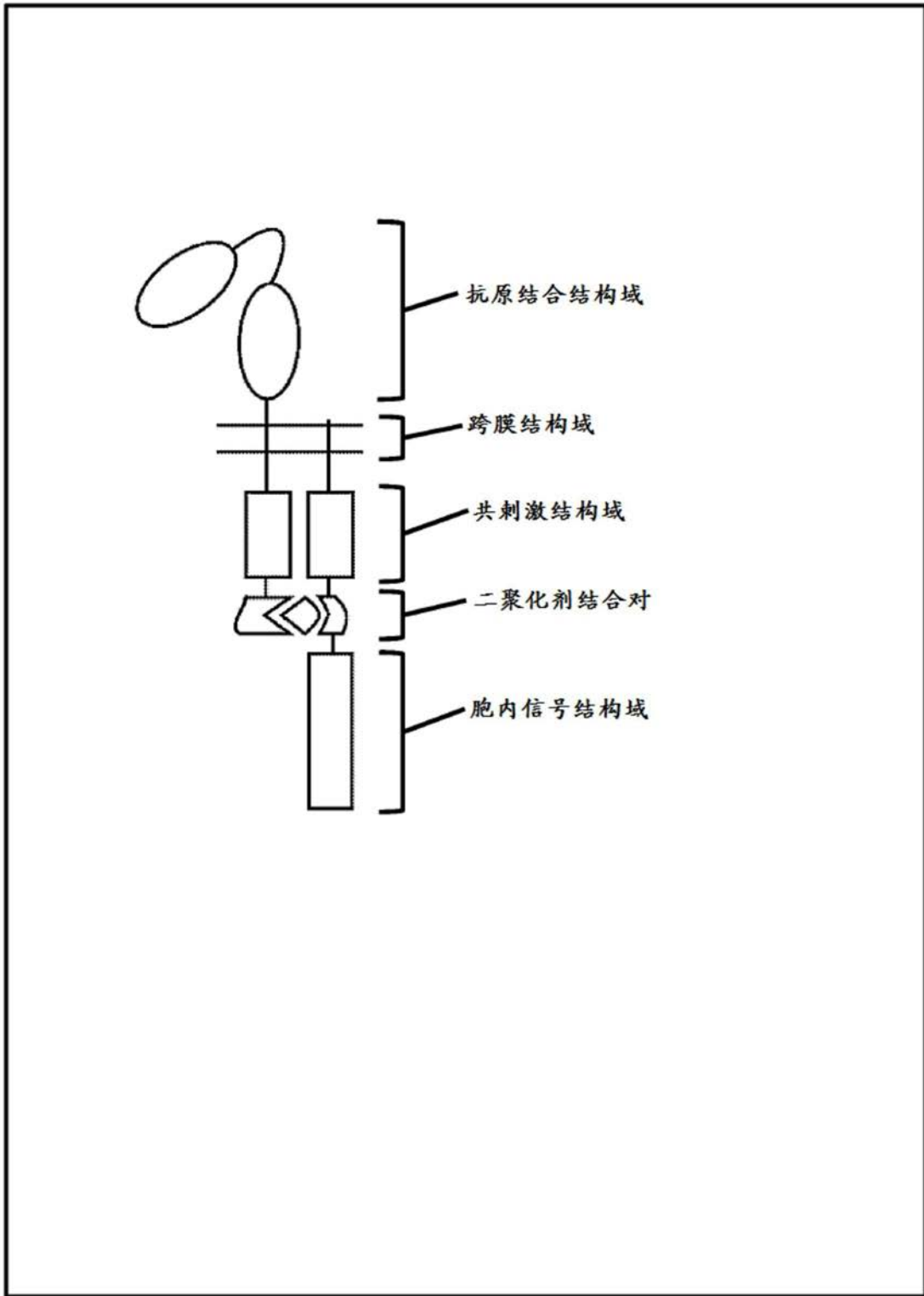


图17

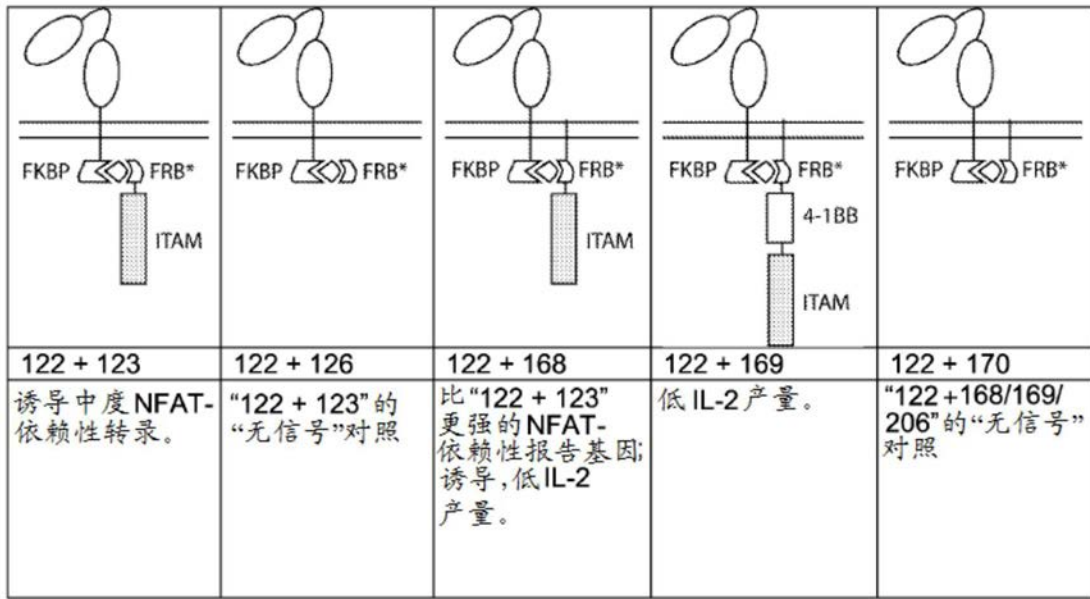


图18A

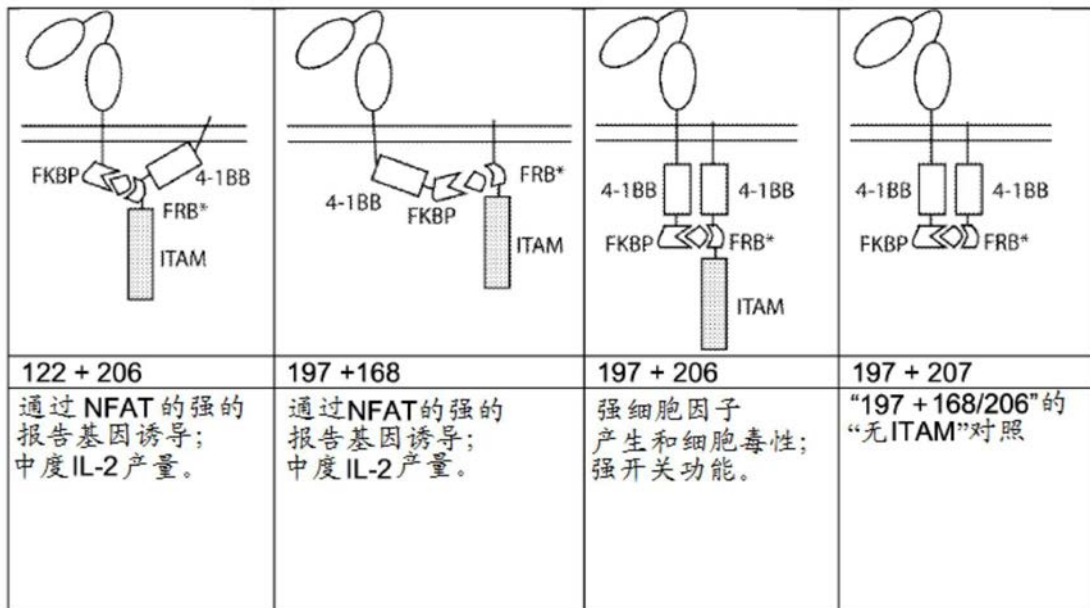


图18B

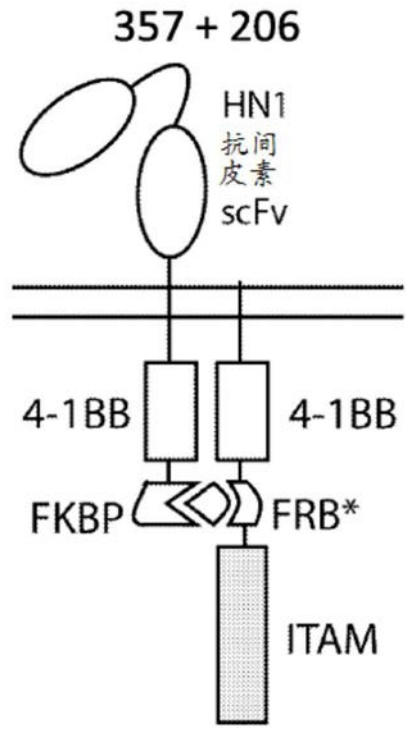


图19A

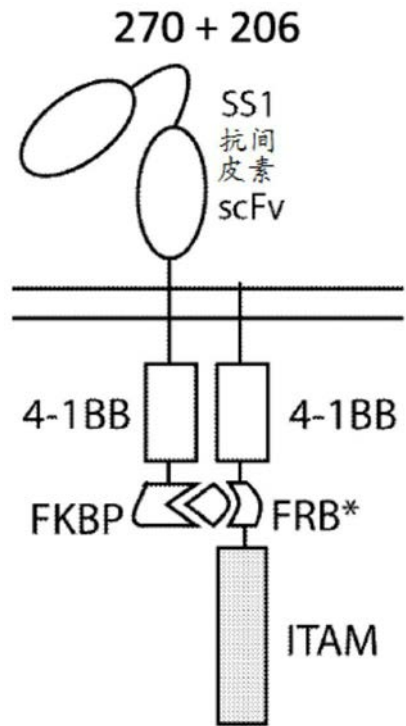


图19B

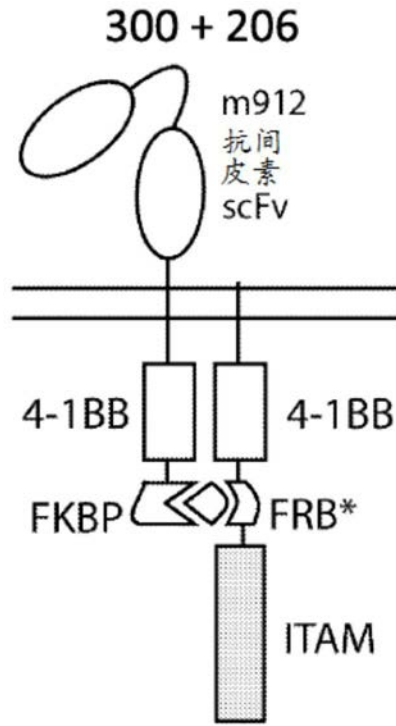


图19C

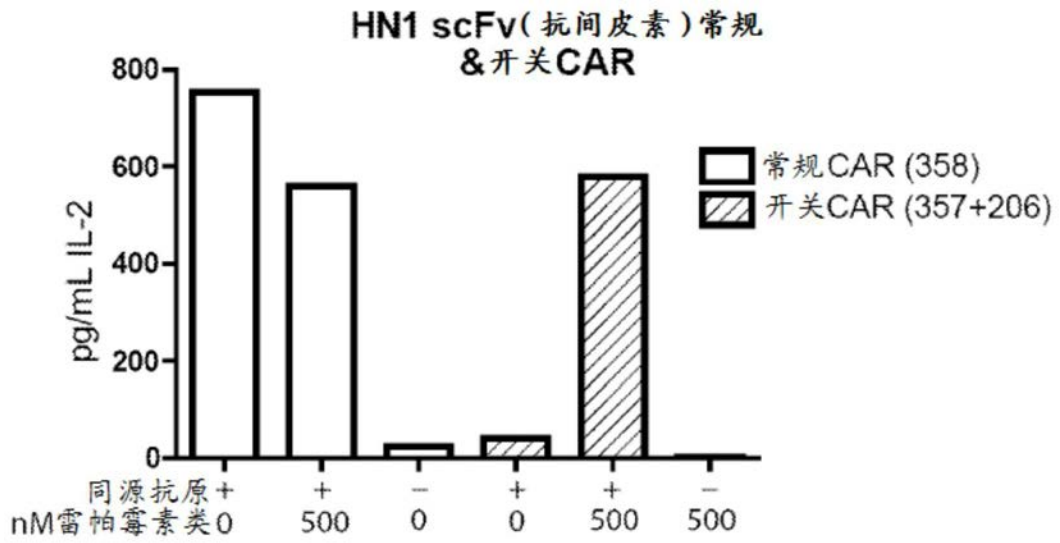


图19D

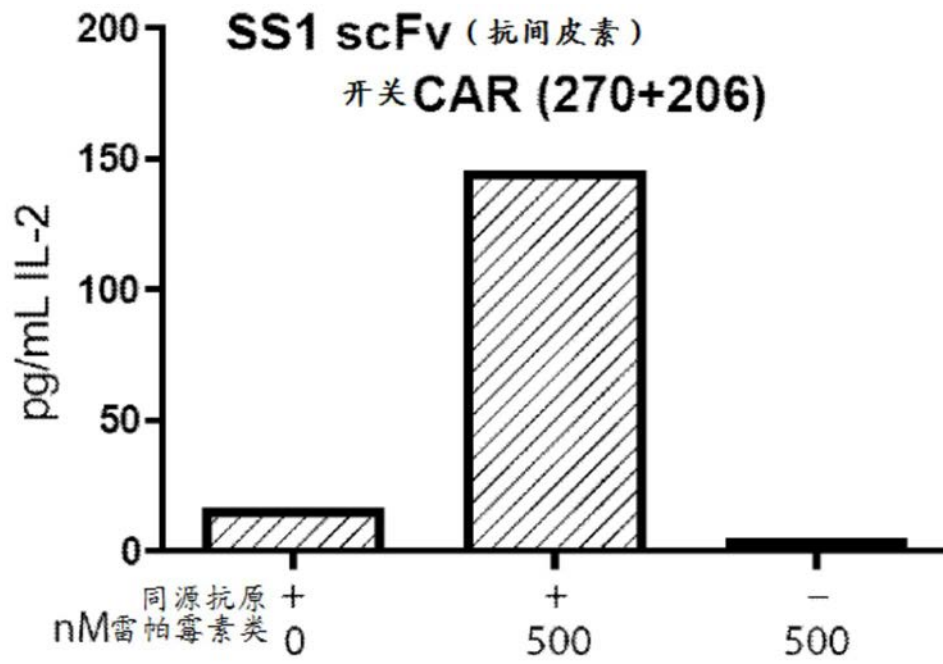


图19E

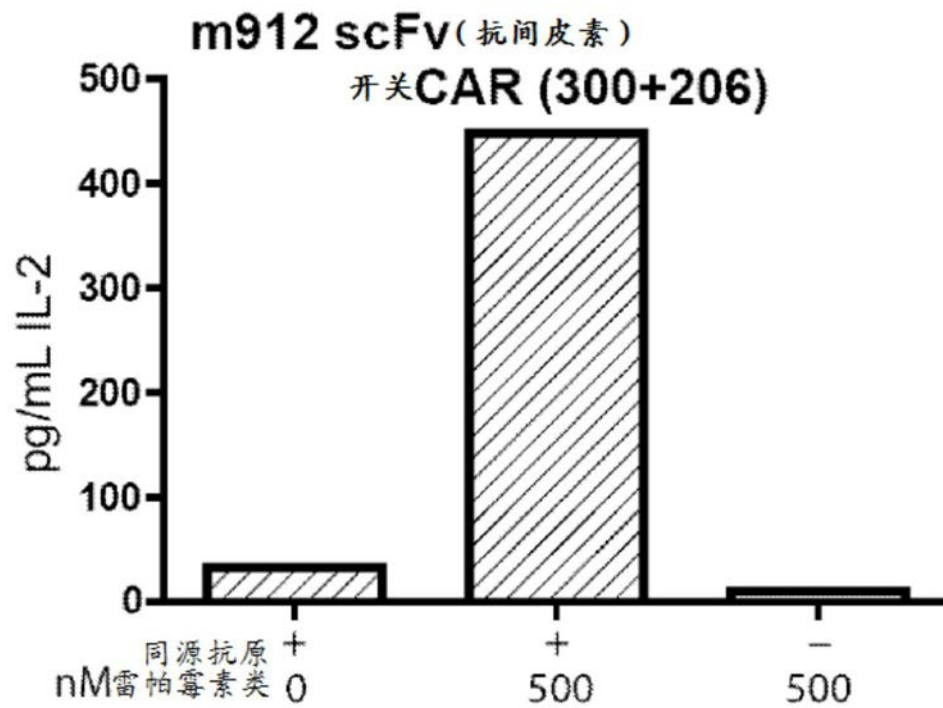


图19F

358

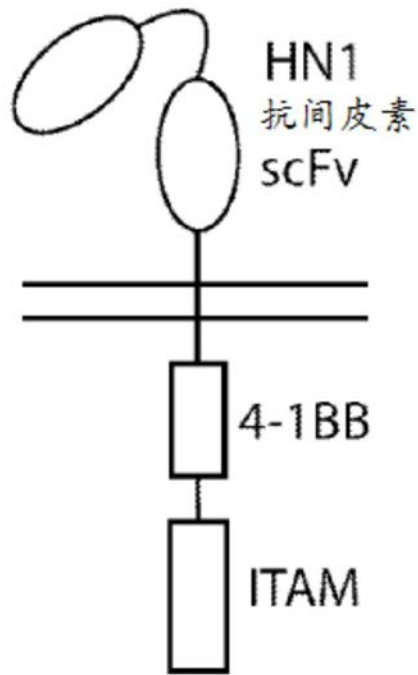


图19G

336 + 337

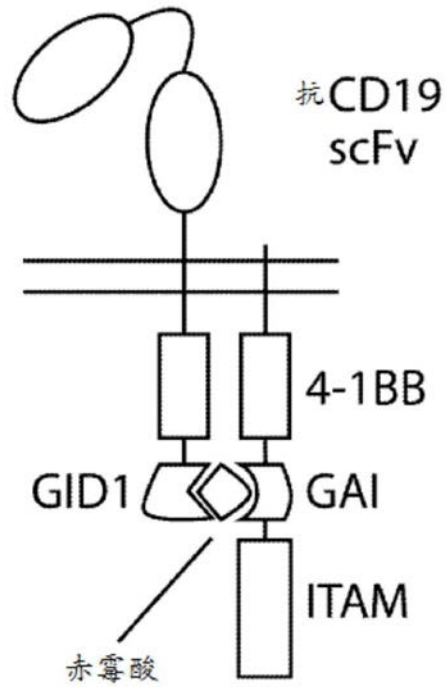


图20A

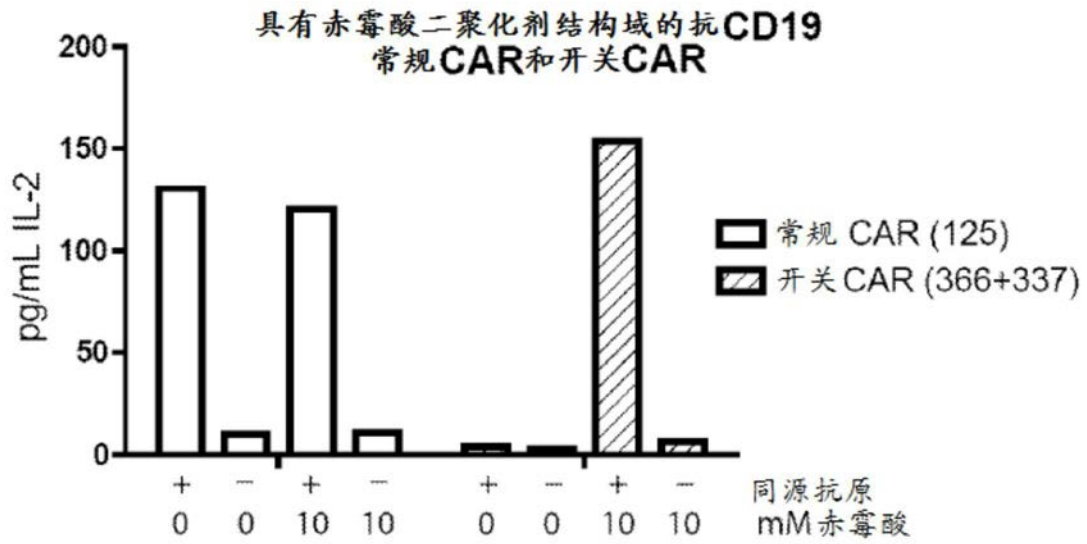


图20B

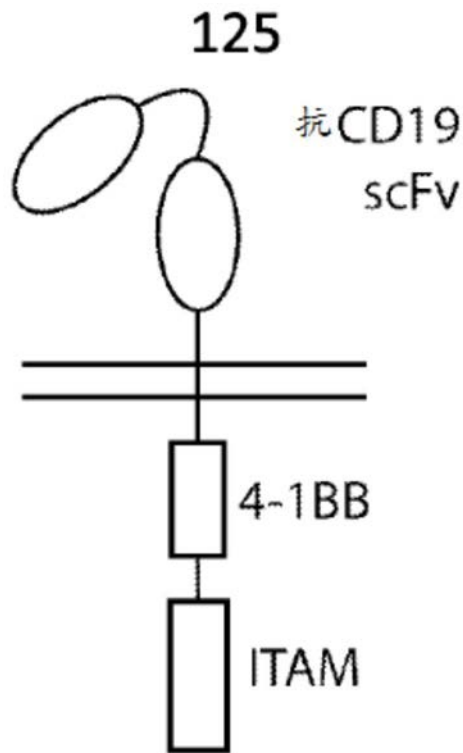


图20C

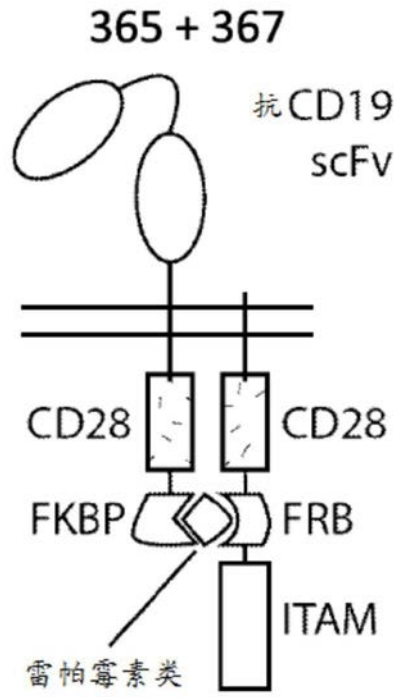


图21A

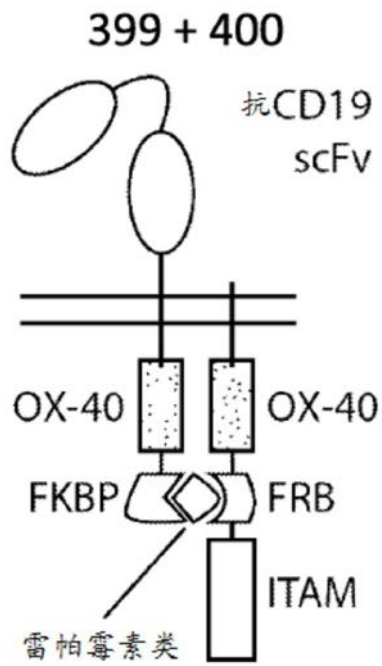


图21B

366

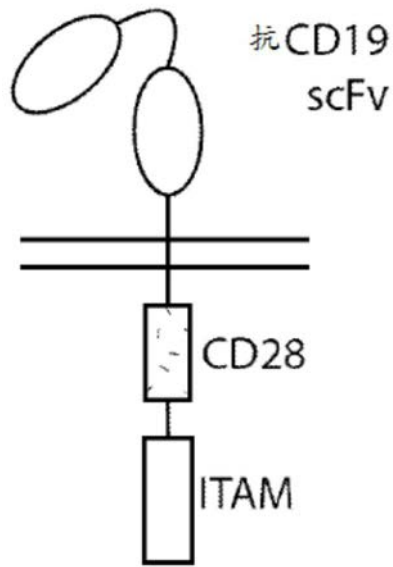


图21C

398

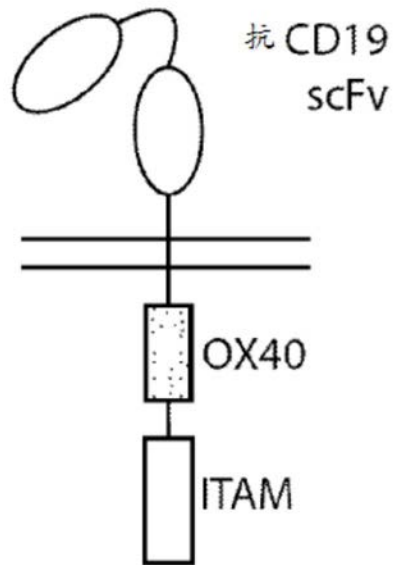


图21D

图22A和图22B.构建体#270, 编码包含“抗间皮素SS1 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域4-1BB胞内链- FKBP”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Flag表位标记:

GATTACAAGGATGACGATGACAAG (SEQ ID NO:132)
DYKDDDDK (SEQ ID NO:123)

抗人间皮素SS1 scFv:

GGATCCCAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCT
GCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCT
TGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGTCTTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCC
ACATTAACGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCTG
CAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTACGCGGGCGGTGGCTCTAGCGGTGGcGGATCGGACATCGAGCTC
ACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAA
GTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATC
CAAACGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTACTCTCTCACAATC
AGCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCTCTCACGTACG
GTGCTGGGACAAAAGTTGGAAATCAAAGCTAGC (SEQ ID NO:133)

GSQVQLQQSGPELEKPGASVKISKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGAS
SYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTITVTVS
SGGGSGGGSSGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPK
RWIYDTSKLGAVPGRFRSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTYGAGTKLE
IKAS (SEQ ID NO:134)

图22A

人 CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCC
 CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
 CATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGC
 (SEQ ID NO:7)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
 LSLVITLYC (SEQ ID NO:8)

接头:

TCCCTA
 SL

人 4-1BB 胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
 AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
 NO:23)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)
 SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

FKBP:

ATGGGAGTcCAGGTGGA AACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGGGCCAGACCTGCG
 TGGTGCAC TACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTT
 TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCCAGATGAGTGTGGGT
 CAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCAC
 CACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAA ACTGGAA (SEQ ID NO:11)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFFMLGKQEVIRGW
 EEGVAQMSVGRRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE (SEQ ID NO:12)

图22B

图23A和图23B. 构建体 #300, 编码包含“抗间皮素m912 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域- 4-1BB 胞内链- FKBP”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Flag表位标记:

GATTACAAGGATGACGATGACAAG (SEQ ID NO:132)
DYKDDDDK (SEQ ID NO:123)

抗人间皮素m912 scFv:

GGATCCCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTCGTGAAGCCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCT
GTACCGTGTCTGGCGGCTCTGTGTCCAGCGGCAGCTACTACTGGTCTTGATCAGACAGCCCCCTGGCAA
GGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACAGCGGCTCCACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGA
GTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATA
CCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGGCAAGAACGGCGCCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACAATGGT
CACCGTGTCTATCTGGTGGAGGAGGATCTGGGGGAGGCGGAAGCGGAGGCGGCGGATCTGATATTCAGATG
ACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACAATTACCTGCCGGGCCAGCCAGA
GCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAACCTGCTGATCTACGCCGC
CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGGCCAGCAGATTTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACC
ATCTCTAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGACCT
TTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:135)

GSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS
TNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGMVTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAP
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO:136)

图23A

人 CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGC
(SEQ ID NO:7)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYC (SEQ ID NO:8)

接头:

TCCCTA

SL

人 4-1BB 胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

FKBP:

ATGGGAGTcCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCG
TGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTT
TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCCAGATGAGTGTGGGT
CAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCAC
CACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGGAA (SEQ ID NO:11)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKFFDSSRDRNKPFFMLGKQEVIRGW
EEGVAQMSVGRRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVLELLKLE (SEQ ID NO:12)

图23B

图24A和图24B.构建体#336, 编码包含“抗-CD19 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域- 4-1BB 胞内链- GID1A ”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

33

Myc 表位标记:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG (SEQ ID NO:3)
EQKLISEEDL (SEQ ID NO:4)

抗人CD19 scFv:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA
GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAACTCCT
GATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT
TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGC
TTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC
GGGTGGCGCGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG
TCCGTACATGCACTGTCTCAGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTCCGCCAGCCTCCAC
GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATC
CAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGAT
GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)

DIQMOTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGG
GSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTY
YNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSVTV
SS (SEQ ID NO:6)

人 CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGCGCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCCTGTTATCACCCCTTTACTGC
(SEQ ID NO:7)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYC (SEQ ID NO:8)

接头:

TCCCTA
SL

图24A

人4-1BB胞内链:

AAACGGGGCAGAAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)
SRSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

GID1A:

ATGGCTGCGAGCGATGAAGTTAATCTTATTGAGAGCAGAACAGTGGTTCCTCTCAATACATGGGTTTTAA
TATCCAACCTCAAAGTAGCCTACAATATCCTTCGTCGCCCTGATGGAACCTTTAACCGACACTTAGCTGA
GTATCTAGACCGTAAAGTCACTGCAAACGCCAATCCGGTTGATGGGGTTTTCTCGTTCGATGTCTTGATT
GATCGCAGGATCAATCTTCTAAGCAGAGTCTATAGACCAGCTTATGCAGATCAAGAGCAACCTCCTAGTA
TTTTAGATCTCGAGAAGCCTGTTGATGGCGACATTGTCCCTGTTATATTGTTCTTCCATGGAGGTAGCTT
TGCTCATTCTTCTGCAAACAGTGCCATCTACGATACTCTTGTGCGCAGGCTTGTGGTTTTGTGCAAGTGT
GTTGTTGTCTCTGTGAATTATCGGCGTGCACCAGAGAATCCATACCCTTGTGCTTATGATGATGGTTGGA
TTGCTCTTAATTGGGTTAACTCGAGATCTTGGCTTAAATCCAAGAAAGACTCAAAGGTCCATATTTCTT
GGCTGGTGATAGCTCTGGAGGTAACATCGCGCATAATGTGGCTTTAAGAGCGGGTGAATCGGGAATCGAT
GTTTGGGGAACATTCTGCTGAATCCTATGTTTGGTGGGAATGAGAGAACGGAGTCTGAGAAAAGTTTGG
ATGGGAAATACTTTGTGACGGTTAGAGACCGGATTGGTACTGGAAAGCGTTTTTACCCGAGGGAGAAGA
TAGAGAGCATCCAGCGTGAATCCGTTTAGCCCCGAGAGGGAAAAGCTTAGAAGGAGTGAGTTTCCCCAAG
AGTCTTGTGGTTGTGCGGGTTTTGGATTTGATTAGAGATTGGCAGTTGGCATAACCGGAAGGGCTCAAGA
AAGCGGGTCAAGAGGTTAAGCTTATGCATTTAGAGAAAGCAACTGTTGGGTTTTACCTCTTGCCTAATAA
CAATCATTTCCATAATGTTATGGATGAGATTTCCGGCGTTTGTAAACCGGAATGTATGCGTGAC (SEQ
ID NO:137)

MAASDEVNLIERSRTVVPLNTWVLISNFKVAYNILRRPDGTFNRHLAEYLDRKVTANANPV
DGVFSFDVLIIDRRINLLSRVYRPAYADQEPPSILDLEKPVGDIVPVILFFHGGSFSAHS
SANSAYDTLCRRLVGLCKCVVSVNYRRAPENPYPCAYDDGWIALNWNRSRWLKS KKD
SKVHIFLAGDSSGGNIAHNVALRAGESGIDVLGNILLNPMFGGNERTESEKSLDGKYFVT
VRDRDWWYKAFLEPEDREHPACNPFSPRGKSLEGVSFPKSLVVVAGLDLIRDWQLAYAE
GLKKAGQEVKLMHLEKATVGFYLLPNNNHFNVMDEISAFVNAECMRD (SEQ ID NO:138)

图24B

图25A和图25B.构建体#337,编码包含“DAP10胞外结构域- CD8 α 跨膜结构域- 4-1BB 胞内链- GAI - CD3 ζ 胞内链- mCherry”的多肽

人 DAP10 信号序列和胞外结构域:

Atgatccatctgggtcacatcctcttcctgcttttgcctcccagtggtgcagctcagacgactccaggag
agagatcatcactccctgcctttaccctggcacttcaggctcttgttccggatgtgggtccctctctct
gccg (SEQ ID NO:27)

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO:28)

人 CD8 α 跨膜结构域

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACT
GC (SEQ ID NO:29)

IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:30)

接头:

Tctctg
SL

人 4-1BB 胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

接头:

GGtTCCGGcAGCGGaTCTGGtAGcGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:31)
GSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:32)

GAI N 末端:

ATGAAGAGAGATCATCATCATCATCATCAAGATAAGAAGACTATGATGATGAATGAAGAAGACGACG
GTAACGGCATGGATGAGCTTCTAGCTGTTCTTGGTTACAAGGTTAGGTCATCCGAAATGGCTGATGTTGC
TCAGAAACTCGAGCAGCTTGAAGTTATGATGTCTAATGTTCAAGAAGACGATCTTTCTCAACTCGCTACT
GAGACTGTTCACTATAATCCGGCGGAGCTTTACACGTGGCTTGATTCTATGCTCACCGACCTTAAT
(SEQ ID NO:139)

MKRDHHHHHHQDKKTMMEEDDGNMDELLAVLGYKVRSEMADVAQKLEQLEVMMSNV
QEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLTDLN (SEQ ID NO:140)

图25A

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)

GSGSGSSSL (SEQ ID NO:16)

人CD3 胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
 TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGG
 AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
 TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
 GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
 NO:17)

RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYN
 ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:18)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
 AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
 GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
 ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCG
 AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
 CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
 ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
 GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
 GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
 GAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGC
 TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLP
 FAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQD
 GEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDA
 EVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID
 NO:22)

图25B

图26A和图26B。构建体#357, 编码包含“抗间皮素HN1 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域4-1BB胞内链- FKBP”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Flag表位标记:

GATTACAAGGATGACGATGACAAG (SEQ ID NO:132)
DYKDDDDK (SEQ ID NO:123)

抗人间皮素HN1 scFv:

GGATCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAGACCAGGGCCAGCGTGCAGGTCTCCT
GTAGAGCCAGCGGCTACAGCATCAACACCTACTACATGCAGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGGCGTGGACT
GGAATGGATGGGCGTGATCAACCCAGCGGCGTGACAAGCTACGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACC
CTGACCAACGACACCAGCACCAACACAGTGTACATGCAGCTGAACAGCCTGACCAGCGCCGACACCCGCCG
TGTACTACTGTGCCAGATGGGCCCTGTGGGGCGACTTCGGCATGGATGTGTGGGGCAAGGGCACCCTCGT
GACCGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGGGATCTGGAGGCGGCGGAAGCGACATCCAGATG
ACCCAGAGCCCTAGCACCCCTGAGCGCCAGCATCGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTGGGCCAGCGAGG
GCATCTATCACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGC
CAGCTCTCTGGCCTCTGGCGCCCTAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACA
ATCAGCAGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACAGCAACTACCCCTGACCT
TCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:141)

GSQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEWMGVINPSGVTS
YAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLNLSLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGLVTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAP
KLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPDDFATYYCQYYSNYPLTFGGGTKL
EIK (SEQ ID NO:142)

图26A

人 CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCC
 CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
 CATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC
 (SEQ ID NO:7)

TTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
 LSLVITLYC (SEQ ID NO:8)

接头:

TCCCTA

SL

人 4-1BB 胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
 AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
 NO:23)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

FKBP:

ATGGGAGTcCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGGGCCAGACCTGCG
 TGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTT
 TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCAGATGAGTGTGGGT
 CAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCAC
 CACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGGAA (SEQ ID NO:11)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDRNKPFKMLGKQEVIRGW
 EEGVAQMSVGRKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE (SEQ ID NO:12)

图26B

图 27A 和图 27B。构建体#365, 编码包含“抗 CD19 scFv - CD8 α 铰链 - CD28 跨膜结构域和胞内链 - FKBP”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Myc 表位标记:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG (SEQ ID NO:3)
EQKLISEEDL (SEQ ID NO:4)

抗人 CD19 scFv:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA
GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAAACTCCT
GATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT
TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGC
TTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC
GGGTGGCGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG
TCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTGCCAGCCTCCAC
GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAACACACATACTATAATTCAGCTCTCAAATC
CAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAATGAT
GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGSGGGGSGGG
GSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY
YNSALKSRLLTIKDNSKQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTV
SS (SEQ ID NO:6)

图27A

人CD8 α 胞外间隔区/铰链:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGCGGTGCCGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ
ID NO:143)

TTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:56)

人CD28跨膜结构域和胞内信号链:

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTA
TTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCC
CGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ
ID NO:144)

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
RDFAAYRS (SEQ ID NO:121)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

FKBP:

ATGGGAGTcCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCG
TGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCCCTCCGGGACAGAAACAAGCCCTT
TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGT
CAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCAC
CACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACCTGGAA (SEQ ID NO:11)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFLGKQEVIRGW
EEGVAQMSVGRRAKLTISPDIYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLLE (SEQ ID NO:12)

图27B

图28A和图28B.构建体#366, 编码包含常规CAR“抗CD19 scFv - CD8 α 铰链- CD28跨膜结构域和胞内链- CD3 ζ 胞内链”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Myc 表位标记:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG (SEQ ID NO:3)
EQKLISEEDL (SEQ ID NO:4)

抗人CD19 scFv:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA
GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAAACTCCT
GATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT
TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGC
TTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC
GGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG
TCCGTACATGCACGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCAC
GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTAAAACACATACTATAATTCAGCTCTCAAATC
CAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGAT
GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGG
GSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY
YNSALKSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTV
SS (SEQ ID NO:6)

图28A

人CD8 α 胞外间隔区/铰链:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ
ID NO:143)

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:56)

人CD28跨膜结构域和胞内链:

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTA
TTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCC
CGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ
ID NO:144)

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
RDFAAAYS (SEQ ID NO:121)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)
SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

人CD3 ζ 胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCtCCTCGC (SEQ ID
NO:25)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR (SEQ ID NO:26)

图28B

图29A和图29B。构建体#367, 编码包含“DAP10胞外结构域- CD28跨膜结构域和胞内链- FRB - CD3 ζ胞内链- mCherry”的多肽

人 DAP10 信号序列和胞外结构域:

Atgatccatctgggtcacatcctcttctctgcttttgcctcccagtggtgcagctcagacgactccaggag
agagatcatcactccctgcctttaccctggcacttcaggctcttgttccggatgtgggtccctctctct
gccg (SEQ ID NO:27)

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSLPAFYPPGTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO:28)

人 CD28 跨膜结构域和胞内信号链:

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTA
TTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCC
CGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ
ID NO:144)

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMPRRPGPTRKHYPYAPP
RDFAAAYS (SEQ ID NO:121)

接头:

GGtTCCGGcAGCGGaTCTGGtAGcGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:31)
GSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:32)

FRB:

ATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACG
TGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA
AACATCCTTTAATCAGGCCATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAA
TCAGGGAATGTCAAGGACCTCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTCCGACGAATCTCAAAG
(SEQ ID NO:33)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLME
AQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFERRISK (SEQ ID NO:34)

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTCCCTA (SEQ ID NO:15)
GSGSGSGSSL (SEQ ID NO:16)

图29A

人CD3胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCCGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
NO:17)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:18)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)
SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
GACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCG
AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCCTCCGACGGCCCCGTA
ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
GAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGC
TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLP
FAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQD
GEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDA
EVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID
NO:22)

图29B

图30A和图30B.构建体#398, 编码包含常规CAR“抗CD19 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域- OX40 & CD3 ζ 胞内链”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Myc 表位标记:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG (SEQ ID NO:3)
EQKLISEEDL (SEQ ID NO:4)

抗人CD19 scFv:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA
GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTAAACTCCT
GATCTACCATACATCAAGATTACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT
TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGC
TTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC
GGGTGGCGGGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG
TCCGTACATGCCTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTCCGCCAGCCTCCAC
GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATC
CAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGAT
GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGSGGGGSGGG
GSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY
YNSALKSRLTIKDNSKQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQTSVTV
SS (SEQ ID NO:6)

人CD8 α 胞外间隔区/铰链:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCAGTGGTTATCACCTTTACTGC
(SEQ ID NO:7)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYC (SEQ ID NO:8)

接头:

TCCCTA
SL

图30A

人 OX40 胞内链:

CGGAGGGACCAGAGGGTGTCCCCCGATGCCCCACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTCCGGACCCCCATCC
AAGAGGAGCAGGCCGACGCCCACTCCACCCTGGCCAAGATC (SEQ ID NO:145)

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:65)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

人 CD3 胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGC (SEQ ID
NO:25)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR (SEQ ID NO:26)

图30B

图31A和图31B.构建体#399, 编码包含“抗CD19 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域 - OX40胞内链 - FKBP”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Myc 表位标记:

GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG (SEQ ID NO:3)
EQKLISEEDL (SEQ ID NO:4)

抗人CD19 scFv:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA
GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTAAACTCCT
GATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTGGAACAGAT
TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGC
TTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTC
GGGTGGCGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG
TCCGTACATGCCTGTCTCAGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTTCGCCAGCCTCCAC
GAAAGGCTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATC
CAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGCTGCAAACCTGAT
GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGG
GSEVKLQESGPLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY
YNSALKSRLTIKDNSKQVFLKMNLSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTV
SS (SEQ ID NO:6)

人CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC
(SEQ ID NO:7)

TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYC (SEQ ID NO:8)

图31A

接头:
TCCCTA
SL

人 OX40 胞内链:

CGGAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCACACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTCCGGACCCCCATCC
AAGAGGAGCAGGCCGACGCCACTCCACCCTGGCCAAGATC (SEQ ID NO:145)

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:65)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)
SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

FKBP:

ATGGGAGTcCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCG
TGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAATTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTT
TAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCAGATGAGTGTGGGT
CAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCAC
CACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGGAA (SEQ ID NO:11)

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFFMLGKQEVIRGW
EEGVAQMSVGRRAKLTISPDIYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE (SEQ ID NO:12)

图31B

图32A和图32B.构建体#400, 编码包含“DAP10胞外结构域- CD8 α 跨膜结构域- OX40胞内链- FRB - CD3 ζ 胞内链- mCherry”的多肽

人DAP10信号序列和胞外结构域:

Atgatccatctgggtcacatcctcttcctgcttttgcctcccagtggtgcagctcagacgactccaggag
agagatcatcactccctgccttttaccctggcacttcaggctcttggtccggatgtgggtccctctctct
gccg (SEQ ID NO:27)

MIHLGHILFLLLLPVAAQTPGERSSLPAYFPPTSGSCSGCSLSLP (SEQ ID NO:28)

人CD8 α 跨膜结构域

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACT
GC (SEQ ID NO:29)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:30)

接头:

Tctctg
SL

人OX40胞内链:

CGGAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCACACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCCGGACCCCCATCC
AAGAGGAGCAGCCGACGCCACTCCACCCTGGCCAAGATC (SEQ ID NO:145)

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:65)

接头:

GGtTCCGGcAGCGGaTCTGGtAGcGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:31)
GSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:32)

FRB:

ATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACG
TGAAAGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCTATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGA
AACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAA
TCAGGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCCGACGAATCTCAAAG
(SEQ ID NO:33)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLME
AQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISK (SEQ ID NO:34)

图32A

接头:

GGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCTTCCCTA (SEQ ID NO:15)

GSGSGSSSL (SEQ ID NO:16)

人CD3 胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
 TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGG
 AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
 TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
 GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID
 NO:17)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
 ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR (SEQ ID NO:18)

接头:

TCGCGAGGAAGCGGGTCCGGTAGCGGATCT (SEQ ID NO:19)

SRGSGSGSGS (SEQ ID NO:20)

mCherry:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG
 AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCA
 GACCGCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
 ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGACATCCCCGACTACTGAAGCTGTCTTCCCCG
 AGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
 CCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA
 ATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
 GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAA
 GGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAAC
 GAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGC
 TGTACAAG (SEQ ID NO:21)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVMHEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLP
 FAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADI PDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQD
 GEFYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDA
 EVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK (SEQ ID
 NO:22)

图32B

图33A和图33B,构建体#358,编码包含常规CAR“抗间皮素HN1 scFv - CD8 α 铰链和跨膜结构域- 4-1BB & CD3 ζ 胞内链”的多肽

信号肽:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO:1)
MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:2)

Flag表位标记:

GATTACAAGGATGACGATGACAAG (SEQ ID NO:132)
DYKDDDDK (SEQ ID NO:123)

抗人间皮素HN1 scFv:

GGATCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAGACCAGGCGCCAGCGTGCAGGTCTCCT
GTAGAGCCAGCGGCTACAGCATCAACACCTACTACATGCAGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCGCTGGACT
GGAATGGATGGGCGTGATCAACCCAGCGGCGTGACAAGCTACGCCAGAAATCCAGGGCAGAGTGACC
CTGACCAACGACACCAGCACCAACACAGTGTACATGCAGCTGAACAGCCTGACCAGCGCCGACACCGCCG
TGTACTACTGTGCCAGATGGGCCCTGTGGGGCGACTTCGGCATGGATGTGTGGGGCAAGGGCACCCTCGT
GACCGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGGGGATCTGGAGGCGGCGGAAGCGACATCCAGATG
ACCCAGAGCCCTAGCACCCTGAGCGCCAGCATCGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCGAGG
GCATCTATCACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGC
CAGCTCTCTGGCCTCTGGCGCCCTAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACA
ATCAGCAGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACAGCAACTACCCCTGACCT
TCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:141)

GSQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEWMGVINPSGVT
YAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLNLSLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGLTVTS
SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASIGDRVITTCRASEGIYHWLAWYQQKPKAP
KLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSDFTLTITSSLPDDFATYYCQYYSNYPLTFGGGTKL
EIK (SEQ ID NO:142)

人CD8 α 胞外间隔区/铰链和跨膜结构域:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC
(SEQ ID NO:7)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYC (SEQ ID NO:8)

图33A

接头:
TCCCTA
SL

人4-1BB胞内链:

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID
NO:23)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)

人CD3ζ胞内链:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGC
TCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGC (SEQ ID
NO:25)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:26)

图33B