



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112334193 A

(43) 申请公布日 2021.02.05

(21) 申请号 201980025035.1

J·维尔丘斯 R·A·罗德里格斯

(22) 申请日 2019.04.10

J·冯

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

62/655725 2018.04.10 US

代理人 罗文锋 彭昶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.10

(51) Int.Cl.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/026840 2019.04.10

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/200007 EN 2019.10.17

(71) 申请人 美国安进公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 凯德药业公司

(72) 发明人 M·J·吉芬 M·托马斯

权利要求书6页 说明书46页

C·穆劳斯基 R·B·凯斯 L·吴

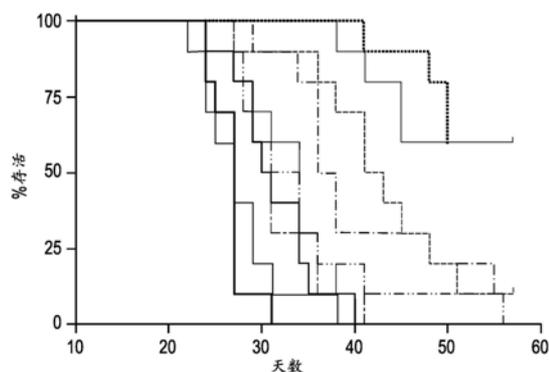
序列表53页 附图12页

(54) 发明名称

DLL3的嵌合受体及其使用方法

(57) 摘要

根据本发明,披露了针对DLL3的抗原结合分子、嵌合受体和工程化的免疫细胞。本发明进一步涉及使用这些DLL3抗原结合分子和工程化的免疫细胞的治疗和/或检测的载体、组合物和方法。



———— PBS  
 ———— NT-对照  
 ———— CAR1 (2:1)  
 - - - - CAR1 (1:1)  
 ······ CAR2 (2:1)  
 - - - - CAR2 (1:1)  
 - - - - CAR3 (2:1)  
 - - - - CAR3 (1:1)  
 ———— CAR4 (2:1)  
 - - - - CAR4 (1:1)

1. 一种嵌合抗原受体, 该嵌合抗原受体包含抗原结合分子, 该抗原结合分子特异性结合到DLL3, 其中该抗原结合分子包含:

a) 可变重链CDR1, 其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:62的氨基酸序列区别不超过3、2、1、或0个氨基酸残基; 或

b) 可变重链CDR2, 其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:63的氨基酸序列区别不超过3、2、1、或0个氨基酸残基; 或

c) 可变重链CDR3, 其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:64的氨基酸序列区别不超过3、2、1、或0个氨基酸残基; 或

d) 可变轻链CDR1, 其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:67的氨基酸序列区别不超过3、2、1、或0个氨基酸残基; 或

e) 可变轻链CDR2, 其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:68的氨基酸序列区别不超过3、2、1、或0个氨基酸残基; 或

f) 可变轻链CDR3, 其包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:69的氨基酸序列区别不超过3、2、1、或0个氨基酸残基; 或

g) 可变重链CDR1, 其包含克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变重链CDR1序列的氨基酸序列; 或

h) 可变重链CDR2, 其包含克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变重链CDR2序列的氨基酸序列; 或

i) 可变重链CDR3, 其包含克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变重链CDR3序列的氨基酸序列; 或

j) 可变轻链CDR1, 其包含克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变轻链CDR1序列的氨基酸序列; 或

k) 可变轻链CDR2, 其包含克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变轻链CDR2序列的氨基酸序列; 或

l) 可变轻链CDR3, 其包含克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变轻链CDR3序列的氨基酸序列; 或

m) 可变重链序列, 其与克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变重链序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个残基; 或

n) 可变轻链序列, 其与克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变轻链序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个残基。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其进一步包含至少一个共刺激结构域。

3. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其进一步包含至少一个激活结构域。

4. 根据权利要求2所述的嵌合抗原受体, 其中该共刺激结构域是以下的信号传导区: CD28、CD8、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1 (PD-1)、可诱导的T细胞共刺激因子 (ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1 (CD11a/CD18)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig $\alpha$  (CD79a)、DAP-10、Fc $\gamma$ 受体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白)、激活型NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、

CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R  $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、或其任何组合。

5. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体,其中该共刺激结构域包含CD28。

6. 根据权利要求5所述的嵌合抗原受体,其中该CD28共刺激结构域包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基的序列。

7. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体,其中该共刺激结构域包含CD8。

8. 根据权利要求7所述的嵌合抗原受体,其中该CD8共刺激结构域包含与SEQ ID NO:14的序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基的序列。

9. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体,其中该共刺激结构域包含4-1BB。

10. 根据权利要求9所述的嵌合抗原受体,其中该CD8共刺激结构域包含与SEQ ID NO:16的序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基的序列。

11. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体,其中该激活结构域包含CD3。

12. 根据权利要求7所述的嵌合抗原受体,其中该CD3包含CD3 $\xi$ 。

13. 根据权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中该CD3 $\xi$ 包含与SEQ ID NO:10的序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基的序列。

14. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中该共刺激结构域包含与SEQ ID NO:2的序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基的序列,并且该激活结构域包含与SEQ ID NO:10的序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基的序列。

15. 一种多核苷酸,该多核苷酸编码如权利要求1所述的嵌合抗原受体。

16. 一种载体,该载体包含如权利要求15所述的多核苷酸。

17. 根据权利要求16所述的载体,该载体为逆转录病毒载体、DNA载体、质粒、RNA载体、腺病毒载体、腺病毒相关载体、慢病毒载体、或其任何组合。

18. 一种免疫细胞,该免疫细胞包含如权利要求16所述的载体。

19. 根据权利要求18所述的免疫细胞,其中该免疫细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、NK细胞、TCR-表达细胞、树突状细胞或NK-T细胞。

20. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中该细胞是自体T细胞。

21. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中该细胞是同种异体T细胞。

22. 根据权利要求18所述的免疫细胞,其中该载体被引入至从患者身体分离的细胞中或被引入至从患者身体取得的样品生长的细胞中。

23. 根据权利要求18所述的免疫细胞,其中该载体被引入至从供体身体分离的细胞中或被引入至从患者身体取得的样品生长的细胞中。

24. 一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求18所述的免疫细胞。

25. 一种嵌合抗原受体,该嵌合抗原受体包含:

- (a) 克隆1H2.1的VH区和克隆1H2.1的VL区；
  - (b) 克隆8D2的VH区和克隆8D2的VL区；或
  - (c) 克隆6B2的VH区和克隆6B2的VL区；
- 其中VH和VL区通过至少一个接头连接。

26. 根据权利要求25所述的嵌合抗原受体,其中该接头包含scFv G4S接头或scFv惠特洛接头。

27. 根据权利要求25所述的嵌合抗原受体,其进一步包含共刺激结构域。

28. 根据权利要求25所述的嵌合抗原受体,其进一步包含激活结构域。

29. 根据权利要求27所述的嵌合抗原受体,其中该共刺激结构域是以下的信号传导区: CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1 (PD-1)、可诱导的T细胞共刺激因子 (ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1 (CD11a/CD18)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig $\alpha$  (CD79a)、DAP-10、Fc $\gamma$ 受体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白)、激活型NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SEPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、或其任何组合。

30. 一种免疫细胞,该免疫细胞包含如权利要求25所述的嵌合抗原受体。

31. 根据权利要求30所述的免疫细胞,其中该免疫细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、NK细胞、TCR-表达细胞、树突状细胞或NK-T细胞。

32. 根据权利要求31所述的T细胞,其是自体T细胞。

33. 根据权利要求32所述的T细胞,其是同种异体T细胞。

34. 一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求30所述的细胞。

35. 一种分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码如权利要求25所述的嵌合抗原受体的序列。

36. 一种载体,该载体包含根据权利要求35所述的多核苷酸。

37. 一种免疫细胞,该免疫细胞包含如权利要求36所述的载体。

38. 根据权利要求37所述的免疫细胞,其中该免疫细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、NK细胞、TCR-表达细胞、树突状细胞或NK-T细胞。

39. 根据权利要求38所述的T细胞,其是自体T细胞。

40. 根据权利要求38所述的T细胞,其是同种异体T细胞。

41. 一种分离的多肽,该分离的多肽包含构建体1H2.1 CD28T、构建体1H2.14-1BB、构建体8D2 CD28T、构建体8D24-1BB、构建体6B2 CD28T、或构建体6B24-1BB的氨基酸序列。

42. 一种载体,该载体编码如权利要求41所述的多肽。

43. 一种免疫细胞,该免疫细胞包含如权利要求41所述的多肽。
44. 根据权利要求43所述的免疫细胞,其中该免疫细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、NK细胞、TCR-表达细胞、树突状细胞或NK-T细胞。
45. 根据权利要求44所述的T细胞,其是自体T细胞。
46. 根据权利要求44所述的T细胞,其是同种异体T细胞。
47. 一种分离的多核苷酸,其编码包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子的嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR),其中该抗原结合分子包含可变重链CDR3,该可变重链CDR3包含克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变重链CDR3的氨基酸序列。
48. 根据权利要求47所述的多核苷酸,其进一步包含激活结构域。
49. 根据权利要求48所述的多核苷酸,其中该激活结构域是CD3。
50. 根据权利要求49所述的多核苷酸,其中该CD3是CD3 $\xi$ 。
51. 根据权利要求50所述的多核苷酸,其中该CD3 $\xi$ 包含SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列。
52. 根据权利要求47所述的多核苷酸,其进一步包含共刺激结构域。
53. 根据权利要求52所述的多核苷酸,其中该共刺激结构域是以下的信号传导区: CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1(PD-1)、可诱导的T细胞共刺激因子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1(CD11a/CD18)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig $\alpha$ (CD79a)、DAP-10、Fc $\gamma$ 受体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、激活型NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、或其任何组合。
54. 根据权利要求53所述的多核苷酸,其中该CD28共刺激结构域编码SEQ ID NO 2中列出的氨基酸序列。
55. 一种载体,该载体包含如权利要求47所述的多核苷酸。
56. 一种免疫细胞,该免疫细胞包含如权利要求55所述的载体。
57. 根据权利要求56所述的免疫细胞,其中该免疫细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、NK细胞、TCR-表达细胞、树突状细胞或NK-T细胞。
58. 根据权利要求57所述的T细胞,其是自体T细胞。
59. 根据权利要求57所述的T细胞,其是同种异体T细胞。
60. 一种编码嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的分离的多核苷酸,所述CAR或TCR包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子,其中该抗原结合分子包含:
- a. 可变重链序列,其与克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变重链序列区别不超过10、

9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个残基；和/或

b. 可变轻链序列，其与克隆1H2.1、克隆8D2、或克隆6B2的可变轻链序列区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个残基。

61. 根据权利要求60所述的多核苷酸，其进一步包含激活结构域。

62. 根据权利要求61所述的多核苷酸，其中该激活结构域是CD3。

63. 根据权利要求62所述的多核苷酸，其中该CD3是CD3 $\xi$ 。

64. 根据权利要求63所述的多核苷酸，其中该CD3 $\xi$ 包含SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列。

65. 根据权利要求60所述的多核苷酸，其进一步包含共刺激结构域。

66. 根据权利要求65所述的多核苷酸，其中该共刺激结构域是以下的信号传导区：CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1 (PD-1)、可诱导的T细胞共刺激因子 (ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1 (CD11a/CD18)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig $\alpha$  (CD79a)、DAP-10、Fc $\gamma$ 受体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白)、激活型NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、或其任何组合。

67. 根据权利要求66所述的多核苷酸，其中该CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:3中列出的核苷酸序列。

68. 根据权利要求67所述的多核苷酸，其中该CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:1中列出的核苷酸序列。

69. 一种分离的多核苷酸，该分离的多核苷酸编码包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子的嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)，其中该抗原结合分子重链包含CDR1 (SEQ ID NO:42)、CDR2 (SEQ ID NO:43)、和CDR3 (SEQ ID NO:44)，并且该抗原结合分子轻链包含CDR1 (SEQ ID NO:47)、CDR2 (SEQ ID NO:48)、和CDR3 (SEQ ID NO:49)。

70. 一种分离的多核苷酸，该分离的多核苷酸编码包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子的嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)，其中该抗原结合分子重链包含CDR1 (SEQ ID NO:52)、CDR2 (SEQ ID NO:53)、和CDR3 (SEQ ID NO:54)，并且该抗原结合分子轻链包含CDR1 (SEQ ID NO:57)、CDR2 (SEQ ID NO:58)、和CDR3 (SEQ ID NO:59)。

71. 一种分离的多核苷酸，该分离的多核苷酸编码包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子的嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)，其中该抗原结合分子重链包含CDR1 (SEQ ID NO:62)、CDR2 (SEQ ID NO:63)、和CDR3 (SEQ ID NO:64)，并且该抗原结合分子轻链包含CDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68)、和CDR3 (SEQ ID NO:69)。

72. 一种治疗有需要的受试者中的疾病或障碍的方法,该方法包括给予该受试者根据权利要求15、47、60、69、70或71所述的多核苷酸。

73. 一种治疗有需要的受试者中的疾病或障碍的方法,该方法包括给予该受试者根据权利要求41所述的多肽。

74. 一种治疗有需要的受试者中的疾病或障碍的方法,该方法包括给予该受试者根据权利要求1或25所述的嵌合抗原受体。

75. 一种治疗有需要的受试者中的疾病或障碍的方法,该方法包括给予该受试者根据权利要求18、30、37、43或56所述的细胞。

76. 一种治疗有需要的受试者中的疾病或障碍的方法,该方法包括给予该受试者根据权利要求24或34所述的药物组合物。

77. 根据权利要求72、73、74、75、或76中任一项所述的方法,其中该疾病或障碍是癌症。

78. 根据权利要求77所述的方法,其中该癌症是肾上腺癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、食管癌、结肠直肠癌、前列腺癌(例如,前列腺腺癌)、胰腺癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、甲状腺癌、肉瘤、胶质母细胞瘤、头颈部肿瘤、大细胞神经内分泌癌(LCNEC)、甲状腺髓样癌、胶质母细胞瘤、神经内分泌前列腺癌、(NEPC)、高等级胃肠胰癌(GEP)和恶性黑色素瘤。

79. 根据权利要求77所述的方法,其中该癌症是小细胞肺癌。

80. 根据权利要求17所述的慢病毒载体,其中该慢病毒载体是pGAR载体。

## DLL3的嵌合受体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年4月10日提交的美国临时专利申请号62/655,725的权益,所述申请的全部内容通过援引并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以ASCII格式电子递交的序列表并且该序列表特此通过引用以其全文并入。所述ASCII副本创建于2019年4月10日,名称为A-2249-W0-PCT\_SL.txt并且大小为86,327字节。

### 背景技术

[0005] 小细胞肺癌 (SCLC) 约占所有确诊肺癌病例的15%,且它是一种侵袭形式的肺癌 (Enstone等人, (2017) *Pharmacoecon Open* [药物经济学公开] doi:10.1007/s41669-017-0045-0; Bunn等人 (2016) *J Thorac Oncol* [胸部肿瘤学杂志]; 11:453-74; Siegel等人, (2016) *CA Cancer J Clin* [临床医师癌症杂志]; 66:7-30)。 $\delta$ 样3 (DLL3) 是Notch受体的 $\delta$ /Serrate/Lag-2配体家族中的一员,被认为在Notch信号传导中发挥作用。DLL3是Notch信号传导途径的抑制性配体,通常只在细胞内膜上表达 (Geffers等人 (2007) *J Cell Biol*; 178:465-76.)。代表性的DLL3蛋白直系同源物包括但不限于:人 (登录号NP\_058637和NP\_982353)、黑猩猩 (登录号XP\_003316395)、小鼠 (登录号NP\_031892)、和大鼠 (登录号NP\_446118)。在人类中,DLL3基因由位于染色体19q13上跨9.5kbp的8个外显子组成。在最后一个外显子内的替代性剪接产生两种加工的转录物,一种为2389个碱基 (登录号NM\_016941) 并且一种为2052个碱基 (登录号NM\_203486)。前一转录物编码一种618个氨基酸的蛋白质 (登录号NP\_058637; SEQ ID NO:29),而后一者编码一种587个氨基酸的蛋白质 (登录号NP\_982353; SEQ ID NO:30)。在某些癌症,诸如SCLC中,已经发现DLL3在细胞表面表达,使其成为一种高度肿瘤选择性的细胞表面蛋白 (Saunders等人 (2015) *Sci Transl Med* [科学转化医学]; 7:302ra136.)。

[0006] 工程化的免疫细胞已显示在治疗性处理中特别是在肿瘤学中具有所希望的质量。两种主要类型的工程化的免疫细胞是含有嵌合抗原受体 (称为“CAR”或“CAR-T”) 和T-细胞受体 (“TCR”) 的细胞。这些工程化的细胞被设计用来赋予它们抗原特异性,同时保留或增强它们识别和杀伤靶细胞的能力。嵌合抗原受体可以包括,例如, (i) 抗原特异性成分 (“抗原结合分子”)、(ii) 一个或多个共刺激结构域、以及 (iii) 一个或多个激活结构域。每个结构域可能是异源的,即由来自不同蛋白质链的序列构成。表达嵌合抗原受体的免疫细胞 (诸如T细胞) 可用于各种治疗,包括癌症治疗。应当认识到的是,如本文所定义的共刺激多肽可用于增强针对靶抗原的表达CAR的细胞的激活,从而提高过继性免疫疗法的效力。

[0007] T细胞可以被设计成对一个或多个所希望的靶标具有特异性。例如,T细胞可以用DNA或编码抗原结合分子的其他遗传物质 (诸如抗体的一个或多个单链可变片段 (“scFv”) 联合一个或多个信号传导分子和/或一个或多个激活结构域 (诸如CD3 $\xi$ ) 转导。

[0008] 除了CAR-T细胞识别和破坏靶细胞的能力外,成功的T细胞疗法还得益于CAR-T细

胞在对抗原的应答中坚持和维持增殖能力的的能力。

[0009] 存在对于鉴定治疗DLL3相关疾病和障碍的新颖疗法和改进疗法的需要。

## 发明内容

[0010] 本发明涉及对DLL3具有特异性的工程化的免疫细胞(诸如CAR或TCR)、抗原结合分子(包括但不限于抗体、scFv、重链和/或轻链以及这些抗原结合分子的CDR)。

[0011] 本发明的嵌合抗原受体通常包括:(i) DLL3特异性抗原结合分子、(ii) 一个或多个共刺激结构域、以及(iii) 一个或多个激活结构域。应当认识到的是,每个结构域可能是异源的,因此,其由来自不同蛋白质链的序列组成。

[0012] 在一些实施例中,本发明涉及嵌合抗原受体,该嵌合抗原受体包含抗原结合分子,该抗原结合分子特异性结合到DLL3上,其中该抗原结合分子包含以下至少一种:(a) 可变重链CDR1,其包含与SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:62的氨基酸序列区别不超过3、2、1或0个氨基酸残基的氨基酸序列;(b) 可变重链CDR2,其包含与SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:63的氨基酸序列区别不超过3、2、1或0个氨基酸残基的氨基酸序列;(c) 可变重链CDR3,其包含与44或SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:64的氨基酸序列区别不超过3、2、1或0个氨基酸残基的氨基酸序列;(d) 可变轻链CDR1,其包含与SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:67的氨基酸序列区别不超过3、2、1或0个氨基酸残基的氨基酸序列;(e) 可变轻链CDR2,其包含与SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:68的氨基酸序列区别不超过3、2、1或0个氨基酸残基的氨基酸序列;(f) 可变轻链CDR3,其包含与SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:69的氨基酸序列区别为不超过3、2、1或0个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0013] 在其他实施例中,该嵌合抗原受体进一步包括至少一个共刺激结构域。在另外的实施例中,该嵌合抗原受体进一步包括至少一个激活结构域。

[0014] 在某些实施例中,该共刺激结构域是以下的信号传导区:CD28、CD28T、CD8、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1(PD-1)、可诱导的T细胞共刺激因子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig $\alpha$ (CD79a)、DAP-10、Fc $\gamma$ 受体、MHC 1类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、激活型NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、或其任何组合。

[0015] 在一些实施例中,该共刺激结构域来自4-1BB。在其他实施例中,该共刺激结构域来自CD28或CD28T。在其他实施例中,该共刺激结构域来自CD8。在其他实施例中,该共刺激

结构域来自OX40。还参见Hombach等人, *Oncoimmunology*. [肿瘤免疫学] 2012年7月1日; 1 (4) : 458-466。在仍然其他实施例中, 该共刺激结构域包含ICOS, 如描述于Guedan等人, 2014年8月14日; *Blood* [血液]: 124 (7) 以及Shen等人, *Journal of Hematology&Oncology* [血液学与肿瘤学杂志] (2013) 6: 33。在仍然其他实施例中, 该共刺激结构域包含CD27, 如描述于Song等人, *Oncoimmunology*. [肿瘤免疫学] 2012年7月1日; 1 (4) : 547-549。

[0016] 在某些实施例中, 该CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 8。在另外的实施例中, 该CD8共刺激结构域包含SEQ ID NO: 14。在另外的实施例中, 该4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO: 16。在另外的实施例中, 该激活结构域包含CD3、CD3 $\xi$ 、或具有在SEQ ID NO: 10中列出的序列的CD3 $\xi$ 。

[0017] 在其他实施例中, 本发明涉及嵌合抗原受体, 其中该共刺激结构域包含SEQ ID NO: 2且激活结构域包含SEQ ID NO: 10。

[0018] 本发明进一步涉及编码嵌合抗原受体的多核苷酸以及包含该多核苷酸的载体。例如, 该载体可以是逆转录病毒载体、DNA载体、质粒、RNA载体、腺病毒载体、腺病毒相关载体、慢病毒载体、或其任何组合。本发明进一步涉及包含该载体的免疫细胞。在一些实施例中, 该慢病毒载体是pGAR载体。

[0019] 示例性免疫细胞包括但不限于T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、NK细胞、TCR-表达细胞、树突状细胞或NK-T细胞。所述T细胞可以是自体、同种异体或异源的。在其他实施例中, 本发明涉及包含本文所述免疫细胞的药物组合物。

[0020] 在某些实施例中, 本发明涉及抗原结合分子 (以及包含这些分子的嵌合抗原受体), 该抗原结合分子包括以下中的至少一种:

[0021] (a) VH区, 其与1H2.1的VH区的氨基酸序列的区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0个氨基酸残基, 和VL区, 其与1H2.1的VL区的氨基酸序列的区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基;

[0022] (b) VH区, 其与8D2的VH区的氨基酸序列的区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0个氨基酸残基, 和VL区, 其与8D2的VL区的氨基酸序列的区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基;

[0023] (c) VH区, 其与6B2的VH区的氨基酸序列的区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0个氨基酸残基, 和VL区, 其与6B2的VL区的氨基酸序列的区别不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、或0个氨基酸残基;

[0024] 并且其中该一个或多个VH和VL区通过至少一个接头连接。

[0025] 在其他实施例中, 本发明涉及抗原结合分子 (以及包含这些分子的嵌合抗原受体), 其中该接头包含scFv G4S接头和scFv惠特洛 (Whitlow) 接头中的至少一个。

[0026] 在其他实施例中, 本发明涉及编码本发明多肽的载体以及包含这些多肽的免疫细胞。优选的免疫细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、NK细胞、TCR-表达细胞、树突状细胞或NK-T细胞。所述T细胞可以是自体、同种异体或异源的。

[0027] 在其他实施例中, 本发明涉及编码包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子的嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR) 的分离的多核苷酸, 其中该抗原结合分子包含可变重 (V<sub>H</sub>) 链CDR3, 该可变重 (V<sub>H</sub>) 链CDR3包含SEQ ID NO: 44或SEQ ID NO: 54或SEQ ID NO: 64的氨基酸序列。该多核苷酸可以进一步包含激活结构域。在优选实施例中, 该激活结构域是CD3,

更优选为CD3 $\xi$ ,更优选为在SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列。

[0028] 在其他实施例中,本发明包括共刺激结构域,例如CD28、CD28T、OX40、CD8、4-1BB/CD137、CD2、CD3 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\xi$ )、CD4、CD5、CD7、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD 33、CD37、CD40、CD 45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1 (CD1 1a/CD18)、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT (肿瘤坏死因子超家族成员14; TNFSF14)、NKG2C、I $\gamma$  (CD79a)、DAP-10、Fc  $\gamma$  受体、MHC I类分子、TNF、TNFr、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子、BTLA、To11配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8  $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R  $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1-1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1-1a、LFA-1、ITGAM、CD1-1b、ITGAX、CD1-1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83配体、或其片段或组合。优选的共刺激结构域是如下文所列举的。

[0029] 在另外的实施例中,本发明涉及编码嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR) 的分离的多核苷酸,其中所述CAR或TCR包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子,并且其中该抗原结合分子包含可变轻 (V<sub>L</sub>) 链CDR3,该可变轻 (V<sub>L</sub>) 链CDR3包含SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:67的氨基酸序列。该多核苷酸可以进一步包含激活结构域。该多核苷酸可以进一步包含共刺激结构域。

[0030] 在其他实施例中,本发明涉及编码包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子的嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR) 的分离的多核苷酸,其中该抗原结合分子重链包含CDR1 (SEQ ID NO:42)、CDR2 (SEQ ID NO:43)、和CDR3 (SEQ ID NO:44) 并且该抗原结合分子轻链包含CDR1 (SEQ ID NO:47)、CDR2 (SEQ ID NO:48)、和CDR3 (SEQ ID NO:49)。

[0031] 在其他实施例中,本发明涉及编码包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子的嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR) 的分离的多核苷酸,其中该抗原结合分子重链包含CDR1 (SEQ ID NO:52)、CDR2 (SEQ ID NO:53)、和CDR3 (SEQ ID NO:54) 并且该抗原结合分子轻链包含CDR1 (SEQ ID NO:57)、CDR2 (SEQ ID NO:58)、和CDR3 (SEQ ID NO:59)。

[0032] 在其他实施例中,本发明涉及编码包含特异性结合至DLL3的抗原结合分子的嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR) 的分离的多核苷酸,其中该抗原结合分子重链包含CDR1 (SEQ ID NO:62)、CDR2 (SEQ ID NO:63)、和CDR3 (SEQ ID NO:64) 并且该抗原结合分子轻链包含CDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68)、和CDR3 (SEQ ID NO:69)。

[0033] 本发明进一步涉及DLL3抗原结合分子,其包含如本文所陈述的至少一个可变重链CDR3或可变轻链CDR3序列。本发明进一步涉及DLL3抗原结合分子,其包含如本文所述的至少一个可变重链CDR1、CDR2、和CDR3序列。本发明进一步涉及DLL3抗原结合分子,其包含如本文所述的至少一个可变轻链CDR1、CDR2、和CDR3序列。本发明进一步涉及DLL3抗原结合分子,其包含如本文所述的可变重链CDR1、CDR2、CDR3,和可变轻链CDR1、CDR2、和CDR3序列。

[0034] 根据本发明的适用于DLL3结合分子的另外的重链和轻链可变结构域以及CDR聚核苷酸和氨基酸序列可以发现于提交于2015年7月31日的美国临时申请号62/199,944。

[0035] 本发明进一步涉及治疗有此需要的受试者中的疾病或障碍的方法,该方法包括给予该受试者根据本发明的抗原结合分子、CAR、TCR、多核苷酸、载体、细胞或组合物。适合治疗的疾病包括但不限于:肾上腺癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、食管癌、结肠直肠癌、前列腺癌(例如,前列腺腺癌)、胰腺癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、甲状腺癌、肉瘤、胶质母细胞瘤、头颈部肿瘤、大细胞神经内分泌癌(LCNEC)、甲状腺髓样癌、胶质母细胞瘤、神经内分泌前列腺癌、(NEPC)、高等级胃肠胰癌(GEP)和恶性黑色素瘤。

## 附图说明

- [0036] 图1描绘了来自健康供体的T细胞中DLL3 CAR的表达。
- [0037] 图2描绘了来自健康供体的慢病毒转导的CAR T细胞的溶细胞活性。
- [0038] 图3描绘了通过来自健康供体的CAR T细胞的细胞因子产生。
- [0039] 图4描绘了响应于表达DLL3的靶细胞,T细胞增殖的流式细胞术分析。
- [0040] 图5描绘了DLL3 CAR T细胞在人SCLC的小鼠异源模型中的体内抗肿瘤活性。
- [0041] 图6描绘了DLL3 CAR T细胞治疗后小鼠SCLC异源模型的存活分析。
- [0042] 图7描绘了pGAR载体图谱。

## 具体实施方式

[0043] 应当认识到的是,嵌合抗原受体(CAR或CAR-T)和T细胞受体(TCR)是基因工程化的受体。这些工程化受体可以根据本领域已知的技术很容易地插入免疫细胞并通过免疫细胞表达,所述免疫细胞包括T细胞。通过CAR,单一的受体可以被编程,使其既能识别特定的抗原,又能在与该抗原结合时激活免疫细胞,攻击并摧毁携带该抗原的细胞。当这些抗原存在于肿瘤细胞上时,表达CAR的免疫细胞可以靶向并杀伤肿瘤细胞。

[0044] 通过掺入与靶抗原相互作用的抗原结合分子,CAR可以被工程化以结合抗原(诸如细胞表面抗原)。优选地,该抗原结合分子是其抗体片段,并且更优选地是一个或多个单链抗体片段(“scFv”)。scFv是单链抗体片段,它具有连接在一起的抗体重链和轻链的可变区。参见美国专利号7,741,465、和6,319,494以及Eshhar等人,Cancer Immunol Immunotherapy[癌症免疫免疫疗法](1997)45:131-136。scFv保留了亲本抗体与靶抗原特异性相互作用的能力。scFv优选用于在嵌合抗原受体中使用,因为它们可以被工程化以作为单链的部分与其他CAR成分被表达。同上还参见Krause等人,J.Exp.Med.[实验医学杂志],第188卷,第4期,1998(619-626);Finney等人,Journal of Immunology[免疫学杂志],1998,161:2791-2797。应当认识到的是,抗原结合分子通常包含在CAR的细胞外部分中,这样它能够识别和结合目的抗原。在本发明的范围内考虑到的是具有对多于一个目的靶标具有特异性的双特异性和多特异性CAR。

[0045] 共刺激结构域。嵌合抗原受体可以掺入共刺激(信号传导)结构域来增强其效力。参见美国专利号7,741,465、和6,319,494,以及Krause等人和Finney等人(同上),Song等人,Blood[血液]119:696-706(2012);Kalos等人,Sci Transl.Med.[科学转化医学]3:95(2011);Porter等人,N.Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]365:725-33(2011),以及Gross等人,Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.[药理学与毒理学年评]56:59-83(2016)。例如,CD28是

一种天然存在于T细胞上的共刺激蛋白。CD28的完整天然氨基酸序列描述于NCBI参考序列：NP\_006130.1。完整的天然CD28核酸序列描述于NCBI参考序列：NM\_006139.1。

[0046] 某些CD28结构域已被用于嵌合抗原受体。根据本发明，现在已经发现新颖的CD28细胞外结构域，称为“CD28T”，在CAR构建体中使用时代外地提供了某些益处。

[0047] CD28T分子的核苷酸序列(包括细胞外CD28T结构域、CD28跨膜结构域和细胞内结构域)在SEQ ID NO:1中列出：

[0048] CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTCGCTGCCTATCGGAGC

[0049] 相应的氨基酸序列在SEQ ID NO:2中列出：

[0050] LDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0051] CD28T的细胞外部分的核苷酸序列在SEQ ID NO:3中列出：

[0052] CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA

[0053] CD28T细胞外结构域的相应的氨基酸序列在SEQ ID NO:4中列出：LDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSK

[0054] CD28跨膜结构域的核苷酸序列在SEQ ID NO:5中列出：

[0055] TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT

[0056] CD28跨膜结构域的氨基酸序列在以下中列出

[0057] SEQ ID NO:6:FWLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIIFWV

[0058] CD28细胞内信号传导结构域的核苷酸序列在SEQ ID NO:7中列出：

[0059] AGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTCGCTGCCTATCGGAGC

[0060] CD28细胞内信号传导结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:8中列出：RSKRSRLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0061] 适用于本发明的另外的CD28序列包括CD28核苷酸序列，其在SEQ ID NO:11中列出：

[0062] ATTGAGGTGATGTATCCACCGCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCATCATTACGTGAAA GGTAACACCTGTGTCTTCTCCCTCTTCCCCGGCCATCAAAGCCC

[0063] 相应的氨基酸序列在SEQ ID NO:12中列出：

[0064] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSK

[0065] 其他的适合的细胞外或跨膜序列可以来自CD8。适合的CD8细胞外和跨膜结构域的核苷酸序列在SEQ ID NO:13中列出：

[0066] GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTAGTCACTTTGTACCAGTGTTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCAGCTCCTACCATCGCTTACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGACCGCCGAGGGGGCGCTGTTTCATACCAGAGGACTGGATTCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCC

TGGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAAC

[0067] 相应的氨基酸序列在SEQ ID NO:14中列出:

[0068] AAALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
YIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCNHRN

[0069] 其他的适合的细胞内信号传导序列可以来自41-BB。适合的41-BB细胞内信号传导结构域的核苷酸序列在SEQ ID NO:15中列出:

[0070] CGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGAGAAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCCG  
GTCCAAACGACTCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTG

[0071] 相应的氨基酸序列在SEQ ID NO:16中列出:

[0072] RFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

[0073] 本发明范围内的适合的共刺激结构域可以来自(除其他来源外) CD28、CD28T、OX40、4-1BB/CD137、CD2、CD3( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\xi$ )、CD4、CD5、CD7、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1(CD11a/CD18))、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT(肿瘤坏死因子超家族成员14;TNFSF14)、NKG2C、I $\gamma$ C(CD79a)、DAP-10、Fc $\gamma$ 受体、MHC I类分子、TNF、TNFR、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83配体、或其片段或组合。

[0074] 激活结构域。

[0075] CD3是天然T细胞上T细胞受体的元件,并且已显示是CAR内重要的细胞内激活元件。在优选的实施例中,CD3是CD3 $\xi$ ,其核苷酸序列在SEQ ID NO:9中列出:

[0076] AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAG  
CTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACC  
AAGACGAAAAAACCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAG  
GCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACT  
TATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG

[0077] 细胞内CD3 $\xi$ 的相应的氨基酸在SEQ ID NO:10中列出:

[0078] RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE  
AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0079] 结构域取向

[0080] 应当认识到的是在结构上,这些结构域对应于免疫细胞相关的位置。因此,这些结构域可以是(i)“铰链”或细胞外(EC)结构域(EC)、(ii)跨膜(TM)结构域、和/或(iii)细胞内(细胞质)结构域(IC)的部分。细胞内成分通常部分包含CD3家族的成员,优选为CD3 $\xi$ ,该CD3

ξ能够在抗原结合分子与其靶标结合后激活T细胞。在一个实施例中,该铰链结构域通常由如本文定义的至少一个共刺激结构域构成。

[0081] 还应当认识到的是铰链区也可能包含免疫球蛋白家族的一些或全部成员,诸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、IgM或其片段。

[0082] 根据本发明的示例性CAR构建体在表1中列出。

[0083] 表1

构建体名称	scFv	共刺激结构域	激活结构域
1H2.1 CD28T	1H2.1	CD28T	CD3ξ
1H2.1 4-1BB	1H2.1	4-1BB	CD3ξ
8D2 CD28T	8D2	CD28T	CD3ξ
8D2 4-1BB	8D2	4-1BB	CD3ξ
6B2 CD28T	6B2	CD28T	CD3ξ
6B2 4-1BB	6B2	4-1BB	CD3ξ

[0085] 与细胞相关的结构域

[0086] 应当认识到的是,相对于携带受体的细胞,本发明的工程化的T细胞包括抗原结合分子(诸如scFv)、细胞外结构域(可能包括“铰链”结构域)、跨膜结构域和细胞内结构域。细胞内结构域至少部分地包含激活结构域,该激活结构域优选地由CD3家族成员(诸如CD3ξ、CD3ε、CD3γ、或其部分)构成。进一步应当认识到的是抗原结合分子(例如,一个或多个scFv)被工程化使其位于分子/构建体的细胞外部分,从而能够识别和结合到其一个或多个靶标上。

[0087] 细胞外结构域。细胞外结构域有利于信号传导和淋巴细胞对抗原的有效应答。本发明中特别有用的细胞外结构域可以来自(即包括):CD28、CD28T、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1(PD-1)、可诱导的T细胞共刺激因子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Iga(CD79a)、DAP-10、Fcγ受体、MHC 1类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、激活型NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL-2Rβ、IL-2Rγ、IL-7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、或其任何组合。细胞外结构域可来自天然来源或合成来源。

[0088] 如本文所述,细胞外结构域通常包含铰链部分。这是细胞外结构域的一部分,有时称为“间隔子”区。根据本发明可以使用多种铰链,包括如上文所述的共刺激分子,以及免疫球蛋白(Ig)序列或其他适合的分子,以达到所希望的与靶细胞的特殊距离。在一些实施例中,整个细胞外区域包括铰链区。在一些实施例中,该铰链区包含CD28T或CD28的EC结构域。

[0089] 跨膜结构域。CAR可被设计成包括融合到该CAR的细胞外结构域的跨膜结构域。它可以类似地融合到CAR的细胞内结构域。在一个实施例中,使用自然与CAR中的一个结构域相关的跨膜结构域。在一些情况下,可以通过氨基酸取代来选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域的结合以最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。跨膜结构域可来自天然来源或合成来源。在来源是天然的情况下,结构域可以衍生自任何膜结合或跨膜蛋白。本发明中特别有用的跨膜区可以来自(即包括):CD28、CD28T、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1(PD-1)、可诱导的T细胞共刺激因子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig $\alpha$ (CD79a)、DAP-10、Fc $\gamma$ 受体、MHC 1类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、激活型NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、或其任何组合。

[0090] 任选地,短接头可以在CAR的任何或部分细胞外、跨膜和细胞内结构域之间形成连接。

[0091] 在一个实施例中,本发明的CAR中的跨膜结构域为CD8跨膜结构域。在一个实施例中,该CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:13的核酸序列的跨膜部分。在另一个实施例中,该CD8跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:14中包含的跨膜氨基酸序列的核酸序列。

[0092] 在某些实施例中,本发明的CAR中的跨膜结构域为CD28跨膜结构域。在一个实施例中,该CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:5的核酸序列。在一个实施例中,该CD28跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:6的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施例中,该CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0093] 细胞内(细胞质)结构域。本发明的工程化的T细胞的细胞内(细胞质)结构域可提供免疫细胞的至少一种正常效应功能的激活。T细胞的效应子功能例如可以是包括细胞因子的分泌的细胞溶解活性或辅助活性。

[0094] 应当认识到的是,适合的细胞内分子包括(即包含)但不限于CD28、CD28T、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1(PD-1)、可诱导的T细胞共刺激因子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig $\alpha$ (CD79a)、DAP-10、Fc $\gamma$ 受体、MHC 1类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、激活型NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、

CD1 1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1 1a、LFA-1、ITGAM、CD1 1b、ITGAX、CD1 1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、或其任何组合。

[0095] 在优选的实施例中,所述CAR的细胞质结构域可被设计为包含CD3 $\xi$ 信号传导结构域本身,或与在本发明的CAR上下文中有用的任何其他所希望的一个或多个细胞质结构域组合。例如,CAR的细胞质结构域可以包含CD3 $\xi$ 链部分和共刺激信号传导区。

[0096] 本发明的CAR的细胞质信号传导部分内的细胞质信号传导序列可以按随机或指定的顺序相互连接。

[0097] 在一个优选的实施例中,该细胞质结构域被设计为包含CD3 $\xi$ 的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在另一个实施例中,该细胞质结构域被设计为包含CD3 $\xi$ 的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域,其中该细胞质CD28包含在SEQ ID NO:15中列出的核酸序列和在SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中,本发明的CAR中的细胞质结构域被设计为包括CD28和CD3 $\xi$ 的一部分,其中该细胞质CD28包含在SEQ ID NO:7中列出的核酸序列和在SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列。CD3 $\xi$ 核酸序列在SEQ ID NO:9中列出,且氨基酸序列在SEQ ID NO:8中列出。

[0098] 应当认识到的是,根据本发明的CAR的一个优选的取向包括抗原结合结构域(诸如scFv)与共刺激结构域和激活结构域串联。共刺激结构域可包含细胞外部分、跨膜部分和细胞内部分的一个或多个。进一步应当认识到的是可以串联使用多个共刺激结构域。

[0099] 在一些实施例中,提供的核酸包括可操作地连接到编码抗原结合分子的第一多核苷酸的启动子、至少一个共刺激分子和激活结构域。

[0100] 在一些实施例中,该核酸构建体包含在病毒载体中。在一些实施例中,该病毒载体选自下组,该组由以下组成:逆转录病毒载体、小鼠白血病病毒载体、SFG载体、腺病毒载体、慢病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体和牛痘病毒载体。在一些实施例中,该核酸包含在质粒中。

[0101] 本发明进一步涉及编码嵌合抗原受体的分离的多核苷酸以及包含该多核苷酸的载体。任何本领域已知的载体都适用于本发明。在一些实施例中,该载体是病毒载体。在一些实施例中,该载体是逆转录病毒载体(诸如pMSVG1)、DNA载体、小鼠白血病病毒载体、SFG载体、质粒、RNA载体、腺病毒载体、杆状病毒载体、Epstein Barr病毒载体、乳头多瘤空泡病毒载体、牛痘病毒载体、单纯疱疹病毒载体、腺病毒相关载体(AAV)、慢病毒载体(诸如pGAR)、或其任何组合。pGAR载体图谱如图7所示。pGAR序列如下:

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGC  
GTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCT  
TTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGG  
GTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTATGG  
TTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCC  
ACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCG  
GTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATG  
AGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTT  
GCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT  
CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTA  
ACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATAC

[0102]

GACTCACTATAGGGCGACCCGGGGATGGCGCGCCAGTAATCAATTACGGGGTCATT  
AGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC  
TGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT  
AGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC  
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT  
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT  
TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTT  
TGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTC  
CACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAAATCAACGGGACTTTCCA  
AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG  
GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACCAG  
ATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA

AGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACT  
AGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAA  
CAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGG  
CTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAA  
AAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATT  
AAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAA  
AGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTC  
GCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACA  
GCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGT  
AGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTT  
TAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCCGC  
CGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTA  
TATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAA  
GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTG  
GGTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTA  
CAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCT  
ATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCA  
GGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATT  
[0103] GGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGA  
GTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGA  
GAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCA  
GCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGA  
ATTGGTTTAAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAG  
GAGGCTTGGTAGGTTTAAAGAATAGTTTTTGTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTA  
GGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCG  
ACAGGCCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCAT  
TCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGA  
TTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACA  
AACTAAAGAATTACAAAAACAATTACAAAATTCAAATTTTATCGCGATCGCGGA  
ATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAG  
GCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAG  
AGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGC  
TCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGA  
GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTAT  
TTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGC  
TCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTTCGAAGTAGATCTT  
TGTCGATCCTACCATCCACTCGACACACCCGCCAGCGGCCGCTGCCAAGCTTCCGAG

[0104]

CTCTCGAATTAATTCACGGTACCCACCATGGCCTAGGGAGACTAGTCGAATCGATAT  
CAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTC  
CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCG  
TATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGT  
TGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCC  
CCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCC  
CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG  
GGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCTGTTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTT  
TTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTAC  
GTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCC GCGGCCTGCTGCCGGCTCTGC  
GGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGC  
CTCCCCGCCTGGTTAATTAAAGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTA  
GATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCGAATTCACTCCCA  
ACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTG  
AGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT  
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAG  
ATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGGCATGCCAGACATGA  
TAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACA ACTAGAATGCAGTGAAAAAATGC  
TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATA  
AACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGT  
GGGAGGTTTTTTGGCGGCCATCGTCGAGGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGAG  
CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT  
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCT  
GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTA  
TTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCCGGCTGCG  
GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG  
ATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAA  
AAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAA  
AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG  
CGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGG  
ATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGT  
AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC  
CCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG  
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC  
GAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
TAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAG

AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGT  
 TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT  
 TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA  
 TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTA  
 AATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA  
 GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC  
 CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAAT  
 GATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAG  
 CCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA  
 TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACG  
 TTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATT  
 [0105] CAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAA  
 AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTT  
 ATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAG  
 ATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCG  
 GCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA  
 GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGA  
 TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTC  
 AGCATCTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGC  
 CGAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTT  
 TCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGA  
 ATGATTTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGC  
 CAC (SEQ ID NO:70)

[0106] 适合的另外的示例性载体包括,例如pBABE-puro、pBABE-neo largeTcDNA、pBABE-hygro-hTERT、pMK0.1GFP、MSCV-IRES-GFP、pMSCV PIG (Puro IRES GFP空质粒)、pMSCV-loxp-dsRed-loxp-eGFP-Puro-WPRE、MSCV IRES荧光素酶、pMIG、MDH1-PGK-GFP\_2.0、TtRMPVIR、pMSCV-IRES-mCherry FP、pRetroX GFP T2A Cre、pRXTN、pLncEXP、和pLXIN-Luc。

[0107] 在一些实施例中,该工程化的细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、NK细胞、TCR-表达细胞、树突状细胞或NK-T细胞。在一些实施例中,该细胞获得自外周血或由外周血制备。在一些实施例中,该细胞获得自外周血单核细胞(PBMC)或由外周血单核细胞(PBMC)制备。在一些实施例中,该细胞获得自骨髓或由骨髓制备。在一些实施例中,该细胞获得自脐带血或由脐带血制备。在一些实施例中,该细胞是人细胞。在一些实施例中,使用选自下组的方法用核酸载体转染或转导细胞,该组由以下组成:电穿孔、声孔效应、生物弹射(例如基因枪)、脂质转染、聚合物转染、纳米颗粒或复合物。

[0108] 在一些实施例中,嵌合抗原受体在包含本申请的核酸的工程化的免疫细胞中表达。在一些实施例中,本应用的这些嵌合抗原受体可以包括,(i)抗原结合分子(诸如scFv)、(ii)跨膜区、和(iii)T细胞活化分子或区域。

[0109] 抗原结合分子

[0110] 抗原结合分子在本发明的范围内。

[0111] 如本文所用的“抗原结合分子”意指任何结合特定靶抗原的蛋白质。在本申请中，指定的靶抗原是DLL3蛋白或其片段。抗原结合分子包括但不限于抗体及其结合部分，例如免疫功能片段。肽体（即，包含肽结合结构域的Fc融合分子）是合适的抗原结合分子的另一个实例。

[0112] 在一些实施例中，该抗原结合分子结合至肿瘤细胞上的抗原。在一些实施例中，该抗原结合分子结合至与过度增殖性疾病有关的细胞上的抗原或结合至病毒或细菌抗原。在某些实施例中，该抗原结合分子结合至DLL3。在另外的实施例中，该抗原结合分子是抗体或其片段，包括其一个或多个互补决定区（CDR）。在另外的实施例中，该抗原结合分子是单链可变片段（scFv）。

[0113] 术语抗原结合分子的“免疫功能片段”（或“片段”）是包含抗体的部分（无论该部分如何获得或合成）抗原结合分子的一种，所述抗体至少缺乏一些存在于全长链上的氨基酸，但仍有能力与抗原特异性结合。此类片段具有生物活性，因为它们与靶抗原结合，并可以与其他抗原结合分子（包括完整的抗体）竞争结合到给定的表位。在一些实施例中，该片段是中和片段。在某些实施例中，该片段可以阻断或降低DLL3的活性。在一个方面，此类片段将保留存在于全长轻链或重链中的至少一个CDR，并且在一些实施例中包含单个重链和/或轻链或其部分。这些片段可以通过重组DNA技术产生，或可以通过抗原结合分子（包括完整的抗体）的酶促或化学裂解产生。

[0114] 免疫功能免疫球蛋白片段包括，但不限于：scFv片段、Fab片段（Fab'、F(ab')<sub>2</sub>等）、一个或多个CDR、双抗体（与轻链可变结构域相同的多肽上的重链可变结构域，经由短肽接头，该接头太短，不允许同一链上的两个结构域之间的配对）、结构域抗体、和单链抗体。这些片段可以来自任何哺乳动物，包括但不限于人、小鼠、大鼠、骆驼或兔。如本领域普通技术人员所理解的，抗原结合分子可以包括非蛋白成分。

[0115] 抗原结合分子的变体也在本发明的范围内，如可变轻链和/或可变重链，每条链与本文所述序列的氨基酸序列具有至少70%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%、95%-97%、97%-99%或99%以上的同一性。在某些情况下，此类分子包括至少一个重链和一个轻链，而在其他情况下，这些变体形式含有两个相同的轻链和两个相同的重链（或其子部分）。本领域技术人员将能够使用熟知的技术如在此所陈述的确定抗原结合分子的合适的变体。在某些实施例中，本领域技术人员可以鉴定分子的合适的区域，这些区域通过靶向被认为对活性不重要的区域在不破坏活性的情况下被改变。

[0116] 在某些实施例中，抗原结合分子的多肽结构基于抗体，包括但不限于：单克隆抗体、双特异性抗体、迷你抗体、结构域抗体、合成抗体（有时在本文中称为“抗体模拟物”）、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、抗体融合（有时在本文中称为“抗体缀合物”）、及分别地其片段。在某些实施例中，该抗原结合分子包含亲和多聚体（avimer）或由亲和多聚体组成。

[0117] 在某些实施例中，单独给予DLL3的抗原结合分子。在其他实施例中，作为CAR、TCR、或其他免疫细胞的部分给予DLL3的抗原结合分子。在此类免疫细胞中，DLL3的抗原分子可以在相同启动子区域或单独的启动子的控制下。在某些实施例中，编码蛋白质制剂的基因和/或DLL3的抗原结合分子可以位于分开的载体中。

[0118] 本发明进一步提供了包含DLL3的抗原结合分子以及药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂的药物组合物。在某些实施例中，药物组合物将包括

多于一种的不同的DLL3抗原结合分子。在某些实施例中,药物组合物将包括多于一种的DLL3的抗原结合分子,其中DLL3抗原结合分子结合多于一个表位。在一些实施例中,各抗原结合分子不会相互竞争结合DLL3。

[0119] 在其他实施例中,可以选择用于胃肠外递送、用于吸入或用于通过消化道(如口服)递送的药物组合物。此类药物可接受的组合物的制备是在本领域技术人员的能力范围内的。在某些实施例中,使用缓冲液将组合物维持在生理pH值或稍低的pH值,通常pH值范围为从约5至约8。在某些实施例中,当考虑进行胃肠外给药时,治疗组合物可以采用无热原的、胃肠外可接受的水溶液的形式,该水溶液包含在药学上可接受的载体中(含有或不含有另外的治疗剂)的所希望的DLL3抗原结合分子。在某些实施例中,用于胃肠外注射的载体是无菌蒸馏水,DLL3的抗原结合分子处于其中,含有或不含有至少一种另外的治疗剂,配制为无菌、等渗溶液,适当保存。在某些实施例中,该制备可以涉及用可以提供用于产物(该产物可以经由储库注射来递送)的受控或持续释放的聚合物化合物(诸如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠粒或脂质体制剂所希望分子。在某些实施例中,可植入药物递送装置可用于引入所希望的分子。

[0120] 在一些实施例中,该抗原结合分子用作诊断或验证工具。该抗原结合分子可用于测定样品和/或受试者中存在的DLL3的量。在一些实施例中,诊断性抗原结合分子不被中和。在一些实施例中,在测定试剂盒和/或用于检测哺乳动物组织或细胞中的DLL3的方法中使用或提供本文披露的抗原结合分子,以筛选/诊断与DLL3水平变化相关的疾病或障碍。所述试剂盒可包含结合DLL3的抗原结合分子,以及指示抗原结合分子与DLL3结合的手段和任选的DLL3蛋白(如果存在)水平。

[0121] 鉴于下面的定义和描述,将进一步理解抗原结合分子。

[0122] “Fc”区包含两个重链片段,其包含抗体的CH1和CH2结构域。两个重链片段通过两个或更多个二硫键并通过CH3结构域的疏水相互作用保持在一起。

[0123] “Fab片段”包含一条轻链和一条重链的CH1和可变区。Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。“Fab'”片段”包含一条轻链和一条重链的一部分,该部分含有VH结构域和CH1结构域以及CH1和CH2结构域之间的区域,使得可以在两个Fab'片段的两个重链之间形成链间二硫键以形成F(ab')<sub>2</sub>分子。“F(ab')<sub>2</sub>片段”含有两条轻链和两条重链,该两条重链含有CH1和CH2结构域之间的恒定区的一部分,使得在两条重链之间形成链间二硫键。因此,F(ab')<sub>2</sub>片段由两个Fab'片段构成,这两个Fab'片段通过两条重链之间的二硫键保持在一起。

[0124] “Fv区”包含来自重链和轻链的可变区,但缺少恒定区。

[0125] “单链可变片段”(“scFv”,也称为“单链抗体”)是指Fv分子,其中重链和轻链可变区通过柔性接头连接形成单个多肽链,其形成抗原结合区。参见PCT申请WO 88/01649和美国专利号4,946,778和5,260,203,这些披露内容通过引用以其全文结合在此。

[0126] “二价抗原结合分子”包含两个抗原结合位点。在一些情况下,两个结合位点具有相同的抗原特异性。二价抗原结合分子可以是双特异性的。“多特异性抗原结合分子”是靶向多于一种抗原或表位的抗原结合分子。“双特异性”、“双重特异性”或“双功能性”抗原结合分子分别是具有两种不同抗原结合位点的杂合抗原结合分子或抗体。双特异性抗原结合分子的两个结合位点将结合两种不同的表位,其可以存在于相同或不同的蛋白质靶标上。

[0127] 当解离常数 ( $K_d$ ) 为约  $1 \times 10^{-7}$ M 时,称抗原结合分子“特异性结合”其靶抗原。当  $K_d$  为  $1-5 \times 10^{-9}$ M 时,抗原结合分子以“高亲和力”特异性结合抗原,当  $K_d$  为  $1-5 \times 10^{-10}$ M 时,抗原结合分子以“非常高的亲和力”特异性结合抗原。在一个实施例中,该抗原结合分子具有为  $10^{-9}$ M 的  $K_d$ 。在一个实施例中,解离速率  $< 1 \times 10^{-5}$ 。在其他实施例中,该抗原结合分子将与人 DLL3 结合,  $K_d$  为约  $10^{-7}$ M 和  $10^{-13}$ M 之间,并且在又一个实施例中,该抗原结合分子将以  $1.0-5 \times 10^{-10}$  的  $K_d$  结合。

[0128] 当抗原结合分子与一个靶标结合比与第二个靶标结合更紧密时,称其是“选择性的”。

[0129] 术语“抗体”是指任何同种型的完整免疫球蛋白,或其可以与完整抗体竞争地特异性结合靶抗原的片段并且包括例如嵌合的、人源化的、完全人的和双特异性的抗体。“抗体”是如本文所定义的抗原结合分子的种类。完整抗体通常包含至少两条全长重链和两条全长轻链,但在一些情况下可包括更少的链,例如天然存在于骆驼科动物中的抗体,其可仅包含重链。抗体可以仅来自单一来源,或者可以是嵌合的,即,抗体的不同部分可以来自如下文进一步描述的两种不同的抗体。抗原结合分子、抗体或结合片段可以在杂交瘤中通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学切割产生。除非另有说明,否则术语“抗体”除了包含两条全长重链和两条全长轻链的抗体外,还包括其衍生物、变体、片段和突变蛋白,其实例如下所述。此外,除非明确排除,抗体包括:单克隆抗体、双特异性抗体、迷你抗体、结构域抗体、合成抗体(有时在本文中称为“抗体模拟物”)、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体、抗体融合(有时在本文中称为“抗体缀合物”)、及分别地其片段。

[0130] 可变区通常表现出通过3个高变区(即“CDR”)连接的相对保守的框架区(FR)的相同的一般结构。来自每对的两条链的CDR通常通过框架区对齐,这可以使得能够结合特定的表位。从N末端到C末端,轻链和重链可变区通常包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。按照惯例,重链中的CDR区通常称为HC CDR1、CDR2和CDR3。轻链中的CDR区通常称为LC CDR1、CDR2和CDR3。每个结构域的氨基酸的分配通常根据Kabat的定义(Seqs of Proteins of Immunological Interest[感兴趣的免疫蛋白质的序列](NIH,Bethesda,MD (1987和1991)),或Chothia(J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901-917(1987);Chothia等人,Nature[自然],342:878-883(1989))。可以采用各种分析方法来鉴定或估计CDR区,不仅包括Kabat或Chothia,还包括AbM定义。

[0131] 术语“轻链”包括全长轻链及其片段,该片段具有足够的可变区序列赋予结合特异性。全长轻链包括可变区结构域 $V_L$ 和恒定区结构域 $C_L$ 。轻链的可变区结构域位于多肽的氨基末端。轻链包括 $\kappa$ 链和 $\lambda$ 链。

[0132] 术语“重链”包括全长重链及其片段,该片段具有足够的可变区序列赋予结合特异性。全长重链包括可变区结构域 $V_H$ 和三个恒定区结构域CH1、CH2和CH3。 $V_H$ 结构域位于多肽的氨基末端, $C_H$ 结构域位于羧基末端,CH3最接近多肽的羧基末端。重链可以是任何同种型,包括IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚型)、IgA(包括IgA1和IgA2亚型)、IgM和IgE。

[0133] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体的轻链和/或重链的一部分,通常包括重链中氨基末端大约120至130个氨基酸和轻链中大约100至110个氨基末端氨基酸。抗体的可变区通常确定特定抗体对其靶标的特异性。

[0134] 可变性在整个抗体的可变结构域中并不均匀分布;它集中在重链可变区和轻链可

变区中的每一个的子结构域中。这些子结构域称为“超变区”或“互补决定区”(CDR)。可变结构域的更保守的(即非超变)部分称为“框架”区(FRM或FR),并且为三维空间中的六个CDR提供支架以形成抗原结合表面。天然存在的重链和轻链的可变结构域各自包含四个FRM区(FR1、FR2、FR3和FR4),这四个FRM区主要采用 $\beta$ -片层构型,通过三个超变区连接,这三个超变区形成连接 $\beta$ -片层结构的环,并且在一些情况下形成 $\beta$ -片层结构的一部分。每条链中的超变区通过FRM紧密靠近在一起,并与来自另一条链的超变区一起有助于抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,上述引文)。

[0135] 术语“CDR”及其复数“CDRs”是指其中三个构成轻链可变区(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)的结合特征并且三个构成重链可变区(CDRH1、CDR-H2和CDR-H3)的结合特征的互补决定区。CDR含有大部分负责抗体与抗原特异性相互作用的残基,并且因此有助于抗体分子的功能活性:它们是抗原特异性的主要决定因素。

[0136] 准确定义的CDR边界和长度受制于不同的分类和编号系统。因此,CDR可以通过Kabat、Chothia、contact或任何其他边界定义(包括本文所述的编号系统)来引用。尽管有不同的边界,但这些系统中的每一者在构成可变序列内所谓的“超变区”的方面具有一定程度的重叠。因此,根据这些系统的CDR定义可以在相对于相邻框架区的长度和边界区域中不同。参见,例如Kabat(一种基于跨物种序列变异性的方法)、Chothia(一种基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法)和/或MacCallum(Kabat等人,上述引文;Chothia等人,J.Mol.Biol[分子生物学杂志],1987,196:901-917;和MacCallum等人,J.Mol.Biol[分子生物学杂志],1996,262:732)。表征抗原结合位点的还另一标准是由牛津大学分子公司(Oxford Molecular)的AbM抗体建模软件使用的AbM定义。参见例如,Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[抗体可变结构域的蛋白质序列和结构分析]在:Antibody Engineering Lab Manual[抗体工程实验室手册](编辑:Duebel,S.和Kontermann,R.,施普林格出版社(Springer-Verlag),海德堡)。就两种残基鉴定技术定义重叠区而非相同区而言,可以将它们组合以定义杂合CDR。然而,根据所谓的Kabat系统进行编号是优选的。

[0137] 典型地,CDR形成可以分类为规范结构的环结构。术语“规范结构”是指由抗原结合(CDR)环所采用的主链构象。从比较结构研究中,已经发现六个抗原结合环中的五个仅具有有限的可用构象组库。每个规范结构可以通过多肽骨架的扭转角来表征。因此,抗体之间的对应环可能具有非常相似的三维结构,但环的大多数部分具有高的氨基酸序列可变性(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],1987,196:901;Chothia等人,Nature[自然],1989,342:877;Martin和Thornton,J.Mol.Biol[分子生物学杂志],1996,263:800)。此外,所采用的环结构与其周围的氨基酸序列之间存在关系。特定规范类别的构象由环的长度和位于环内关键位置以及保守框架内(即,环外)的氨基酸残基决定。因此,可以基于这些关键氨基酸残基的存在对特定的规范类别进行分配。

[0138] 术语“规范结构”还可以包括关于抗体的线性序列的考虑因素,例如,如通过Kabat(Kabat等人,上述引文)编目的。Kabat编号方案(系统)是以一致方式对抗体可变结构域的氨基酸残基进行编号的广泛采用的标准,并且是本发明应用的优选方案,也如本文其他地方所提及。另外的结构考虑因素也可以用于确定抗体的规范结构。例如,Kabat编号未完全反映的那些差异可以通过Chothia等人的编号系统来描述,并且/或者通过其他技术(例如

结晶学和二维或三维计算建模)来揭示。因此,可以将给定的抗体序列置于规范的类别中,该类别尤其允许鉴定适当的基础结构(chassis)序列(例如,基于在文库中包括多种规范结构的期望)。文献中描述了抗体氨基酸序列的Kabat编号和如由Chothia等人,上述引文所述的结构考虑因素以及其参与解释抗体结构的规范方面。不同类别免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型在本领域中是熟知的。关于抗体结构的综述,参见Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室],Harlow等人编辑,1988。

[0139] 轻链的CDR3以及特别是重链的CDR3可以构成轻链可变区和重链可变区内抗原结合中最重要的决定簇。在一些抗体构建体中,重链CDR3似乎构成抗原与抗体之间主要的接触区域。其中单独改变CDR3的体外选择方案可以用于改变抗体的结合特性或确定哪些残基有助于抗原的结合。因此,CDR3典型地是抗体结合位点内分子多样性的最大来源。例如,H3可以短至两个氨基酸残基或多于26个氨基酸。

[0140] 术语“中和”分别指抗原结合分子、scFv或抗体,其结合配体并防止或降低该配体的生物学效应。这可以通过例如直接阻断配体上的结合位点或通过结合配体并通过间接方式(例如配体中的结构或能量改变)改变配体结合的能力来完成。在一些实施例中,该术语还可以表示抗原结合分子,其阻止与其结合的蛋白质发挥生物学功能。

[0141] 术语“靶标”或“抗原”是指能够被抗原结合分子结合的分子或分子的一部分。在某些实施例中,靶标可具有一个或多个表位。

[0142] 当用于竞争相同表位的抗原结合分子的上下文中时,术语“竞争”意指抗原结合分子之间的竞争,该竞争通过其中待测试的抗原结合分子(例如,其抗体或免疫功能片段)阻止或抑制(例如,降低)参考抗原结合分子与抗原的特异性结合的测定而确定。许多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合分子是否与另一种抗原结合分子竞争,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA),夹心法竞争测定(Stahli等人,1983,Methods in Enzymology[酶学方法]9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Kirkland等人,1986,J.Immunol.[免疫学杂志]137:3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心法测定(Harlow和Lane,1988,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press[抗体,实验室手册,冷泉港出版社]);使用1-125标记固相直接标记RIA(Morel等人,1988,Molec.Immunol.[分子免疫学]25:7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung,等人,1990,Virology[病毒学]176:546-552);和直接标记的RIA(Moldenhauer等人,1990,Scand.J.Immunol.[斯堪的纳维亚免疫学杂志]32:77-82)。术语“表位”包括能够被抗原结合分子结合的任何决定簇,例如本发明的scFv、抗体或免疫细胞。表位是靶向抗原的抗原结合分子结合的该抗原的区域,并且当该抗原是蛋白质时,其包括直接接触抗原结合分子的特定氨基酸。

[0143] 如本文所用,术语“标记”或“标记的”是指掺入可检测标记物,例如通过掺入放射性标记的氨基酸或附着于生物素部分的多肽(其可以通过标记的抗生物素蛋白(例如含有荧光标志物或可通过光学或比色法检测的酶活性的链霉亲和素)检测)。在某些实施例中,标记或标志物也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的并且可以使用。

[0144] 根据本发明,本文可以包括开-关或其他类型的控制转换技术。这些技术可以使用

二聚化结构域和此类结构域二聚化的任选的活化剂。这些技术包括例如Wu等人, Science [科学] 2014350 (6258) utilizing FKBP/Rapalog dimerization systems in certain cells [在某些细胞中使用FKBP/Rapalog二聚化系统] 描述的那些技术, 其内容通过引用以其整体结合在此。另外的二聚化技术描述于例如Fegan等人 Chem. Rev. [化学评论] 2010, 110, 3315-3336 以及美国专利号 5,830,462; 5,834,266; 5,869,337; 和 6,165,787, 其内容也通过引用以其整体结合在此。另外的二聚化对可包括环孢菌素-A/亲环蛋白受体、雌激素/雌激素受体 (任选使用他莫昔芬)、糖皮质激素/糖皮质激素受体、四环素/四环素受体、维生素D/维生素D受体。二聚化技术的其他实例可以在例如 WO 2014/127261、WO 2015/090229、US 2014/0286987、US 2015/0266973、US 2016/0046700、美国专利号 8,486,693、US 2014/0171649、和 US 2012/0130076 中找到, 其内容通过引用以其整体进一步结合在此。

#### [0145] 治疗方法

[0146] 使用过继性免疫疗法, 天然T细胞可以 (i) 从患者体内中移除、(ii) 基因工程化以表达与至少一种肿瘤抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR)、(iii) 离体扩增为更大的工程化T细胞群体、以及 (iv) 重新引入患者体内。参见例如美国专利号 7,741,465、和 6,319,494, Eshhar等人 (Cancer Immunol [癌症免疫学], 同上); Krause等人 (同上); Finney等人 (同上)。在将工程化的T细胞重新引入患者体内后, 它们介导针对表达肿瘤抗原的细胞的免疫应答。参见例如 Krause等人, J. Exp. Med. [实验医学杂志], 第188卷, 第4期, 1998 (619-626)。该免疫应答包括T细胞分泌IL-2和其他细胞因子, 识别肿瘤抗原的T细胞的克隆扩增, 以及T细胞介导的阳性靶细胞的特异性杀伤。参见 Hombach等人, Journal of Immun. [免疫学杂志] 167:6123-6131 (2001)。

[0147] 在一些方面, 本发明因此包括治疗或预防与患者中不希望的和/或升高的DLL3水平相关的病症的方法, 该方法包括给予有此需要的患者有效量的至少一种本文披露的分离的抗原结合分子、CAR、或TCR。

[0148] 提供了用于治疗疾病或障碍 (包括癌症) 的方法。在一些实施例中, 本发明涉及在受试者中产生T细胞介导的免疫应答, 包括给予受试者有效量的本申请的工程化的免疫细胞。在一些实施例中, T细胞介导的免疫应答直接针对靶细胞或细胞。在一些实施例中, 该工程化的免疫细胞包含嵌合抗原受体 (CAR)、或T细胞受体 (TCR)。在一些实施例中, 该靶细胞是肿瘤细胞。在一些方面, 本发明包括治疗或预防恶性肿瘤的方法, 所述方法包括给予有此需要的受试者有效量的至少一种本文所述的分离的抗原结合分子。在一些方面, 本发明包括治疗或预防恶性肿瘤的方法, 所述方法包括给予有此需要的受试者有效量的至少一种免疫细胞, 其中该免疫细胞包含至少一种如本文所述的嵌合抗原受体、T细胞受体和/或分离的抗原结合分子。

[0149] 在一些方面, 本发明包括药物组合物, 其包含至少一种如本文所述的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂。在一些实施例中, 该药物组合物进一步包含另外的活性剂。

[0150] 本发明的抗原结合分子、CAR、TCR、免疫细胞等可用于治疗髓系疾病, 包括但不限于肾上腺癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、食管癌、结肠直肠癌、前列腺癌 (例如, 前列腺腺癌)、胰腺癌、肺癌 (包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、甲状腺癌、肉瘤、胶质母细胞瘤、头颈部肿瘤、大细胞神经内分泌癌 (LCNEC)、甲状腺髓样癌、胶质母细胞瘤、神经内分泌前列腺癌、(NEPC)、高等级胃肠胰癌 (GEP) 和恶性黑色素瘤。

[0151] 应当认识到的是, CAR<sup>+</sup>/CAR-T<sup>+</sup>/TCR<sup>+</sup>细胞的靶剂量的范围可以从 $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^{10}$ 个细胞/kg, 优选 $2 \times 10^6$ 个细胞/kg, 更优选。应当认识到的是, 高于和低于该范围的剂量可能适合于某些受试者, 并且适当的剂量水平可以由健康护理提供者根据需要确定。另外, 根据本发明可以提供多剂量的细胞。

[0152] 还提供了用于减小受试者中肿瘤大小的方法, 该方法包括给予受试者本发明的工程化的细胞, 其中该细胞包含嵌合抗原受体、T细胞受体、或基于T细胞受体的嵌合抗原受体(其包含与肿瘤上的抗原结合的抗原结合分子)。在一些实施例中, 该受试者患有实体瘤或血液恶性肿瘤, 例如淋巴瘤或白血病。在一些实施例中, 将该工程化的细胞递送至瘤床。在一些实施例中, 该癌症存在于受试者的骨髓中。

[0153] 在一些实施例中, 该工程化的细胞是自体T细胞。在一些实施例中, 该工程化的细胞是同种异体T细胞。在一些实施例中, 该工程化的细胞是异源T细胞。在一些实施例中, 本申请的工程化的细胞在体内转染或转导。在其他实施例中, 该工程化的细胞离体转染或转导。

[0154] 该方法可以进一步包括给予一种或多种化学治疗剂。在某些实施例中, 该化学治疗剂是淋巴细胞耗尽(预调节)化学治疗剂。有益的预调节治疗方案以及相关的有益生物标志物描述于美国临时专利申请62/262,143和62/167,750中, 其通过引用整体并入本文。这些描述了例如调节需要T细胞疗法的患者的方法, 该方法包括给予患者指定的有益剂量的环磷酰胺( $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 和 $2000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间)和特定剂量的氟达拉滨( $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 和 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间)。优选的剂量方案包括治疗患者, 包括每天给予患者约 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的环磷酰胺和约 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的氟达拉滨, 持续3天, 然后给予患者治疗有效量的工程化的T细胞。

[0155] 在其他实施例中, 抗原结合分子、转导的(或以其他方式工程化的)细胞(例如CAR或TCR)和化学治疗剂各自以有效量给予以治疗受试者的疾病或病症。

[0156] 在某些实施例中, 本文披露的包含表达CAR的免疫效应细胞的组合物可与任意数量的化学治疗剂联合给予。化学治疗剂的实例包括烷基化剂, 诸如噻替哌和环磷酰胺(CYTOXAN<sup>TM</sup>); 烷基磺酸盐, 诸如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶类, 诸如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa); 乙撑亚胺和甲基蜜胺(methylamelamine), 包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine); 氮芥, 诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新恩比兴(novembichin)、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲(nitrosurea), 诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀; 抗生素, 诸如阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌菌素、色霉素、更生霉素、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星; 抗代谢药, 诸如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;

嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU;雄激素,诸如卡鲁睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺药,诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;倍曲布西 (bestrabucil);比生群 (bisantrene);依达曲沙 (edatraxate)、地磷酰胺 (defofamine);秋水仙胺;地吡醌;依氟鸟氨酸 (elformithine);依利醋铵;依托格鲁 (etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脞;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶 (nitracrine);喷司他丁;蛋氨酸芥;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK<sup>®</sup>;丙亚胺;西佐喃;锗螺胺 (spirogermanium);细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;派泊溴烷;加西托星 (gacytosine);阿拉伯糖苷 ("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷,例如紫杉醇 (TAXOL<sup>™</sup>,百时美施贵宝公司 (Bristol-Myers Squibb)) 和多西他赛 (doxetaxel) (TAXOTERE<sup>®</sup>,罗纳普朗克公司 (Rhone-Poulenc Rorer));苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷 (VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;去甲长春碱;诺肖林 (novantrone);替尼泊苷;道诺霉素;氨蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);视黄酸衍生物诸如Targretin<sup>™</sup> (蓓萨罗丁)、Panretin<sup>™</sup>、(阿利维A酸);ONTAK<sup>™</sup> (地尼白介素);埃斯波霉素 (esperamicin);卡培他滨;以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。该定义中还包括用于调控或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,诸如抗雌激素剂,包括例如,他莫昔芬、雷洛西芬 (raloxifene)、芳香化酶抑制性4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (法乐通);和抗雄激素类,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在适当的情况下也给予化学治疗剂的组合,包括但不限于CHOP (即环磷酰胺 (Cytosan<sup>®</sup>))、多柔比星 (羟基多柔比星)、长春新碱 (Oncovin<sup>®</sup>)、和泼尼松。

[0157] 在一些实施例中,该化学治疗剂在给予工程化的细胞或核酸的同一时间或一周内给予。在其他实施例中,该化学治疗剂在给予工程化的细胞或核酸后的1至4周或1周至1个月、1周至2个月、1周至3个月、1周至6个月、1周至9个月或1周至12个月给予。在其他实施例中,该化学治疗剂在给予细胞或核酸之前至少1个月给予。在一些实施例中,该方法进一步包括给予两种或更多种化学治疗剂。

[0158] 多种另外的治疗剂可以与本文所述的组合物结合使用。例如,潜在有用的另外的治疗剂包括PD-1抑制剂,例如纳武单抗 (Opdivo<sup>®</sup>)、兰洛利珠单抗 (Keytruda<sup>®</sup>)、兰洛利珠单抗、匹地利珠单抗、和阿特利珠单抗。

[0159] 艾卢替尼 (Imbruvica<sup>®</sup>)、奥法妥木单抗 (Arzerra<sup>®</sup>)、瑞妥昔单抗 (Rituxan<sup>®</sup>)、贝伐赛珠单抗 (Avastin<sup>®</sup>)、曲妥珠单抗 (Herceptin<sup>®</sup>)、恩星-曲妥珠单抗 (KADCYLA<sup>®</sup>)、伊马替尼 (Gleevec<sup>®</sup>)、塞妥昔单抗 (Erbix<sup>®</sup>)、帕尼妥木单抗 (Vectibix<sup>®</sup>)、卡妥

玛索单抗 (catumaxomab)、艾瑞妥莫单抗 (ibritumomab)、奥法妥木单抗 (ofatumumab)、托司妥莫单抗 (tositumomab)、布伦妥昔单抗 (brentuximab)、阿仑妥珠单抗 (alemtuzumab)、吉妥珠单抗 (gemtuzumab)、厄洛替尼 (erlotinib)、格非替尼 (gefitinib)、凡德他尼 (vandetanib)、阿法替尼 (afatinib)、拉帕替尼 (lapatinib)、奈雷替尼 (neratinib)、阿昔替尼 (axitinib)、玛司替尼 (masitinib)、帕佐帕尼 (pazopanib)、舒尼替尼 (sunitinib)、索拉非尼 (sorafenib)、托舍拉尼 (toceranib)、来他替尼 (lestaurtinib)、阿昔替尼 (axitinib)、塞地拉尼 (cediranib)、仑伐替尼 (lenvatinib)、尼达尼布 (nintedanib)、帕佐帕尼 (pazopanib)、瑞拉非尼 (regorafenib)、瑟玛沙尼 (semaxanib)、索拉非尼 (sorafenib)、舒尼替尼 (sunitinib)、替沃扎尼 (tivozanib)、托舍拉尼 (toceranib)、万迪他尼 (vandetanib)、恩曲替尼 (entrectinib)、卡赞替尼 (cabozantinib)、伊马替尼 (imatinib)、达沙替尼 (dasatinib)、尼洛替尼 (nilotinib)、珀那替尼 (ponatinib)、雷多替尼 (radotinib)、柏舒替尼 (bosutinib)、来他替尼 (lestaurtinib)、卢利替尼 (ruxolitinib)、帕利替尼 (pacritinib)、考美替尼 (cobimetinib)、舍美替尼 (selumetinib)、曲美替尼 (trametinib)、比美替尼 (binimetinib)、阿来替尼 (alectinib)、塞利替尼 (ceritinib)、克佐替尼 (crizotinib)、阿柏西普 (aflibercept)、adipotide、地尼白介素 (denileukin diftitox)、mTOR抑制剂 (例如依罗莫司 (Everolimus) 和特罗莫司 (Temsirrolimus))、hedgehog抑制剂 (例如索尼德吉 (Sonidegib) 和维莫德吉 (vismodegib))、CDK抑制剂 (例如CDK抑制剂 (帕博西尼 (Palbociclib)))。

[0160] 在另外的实施例中,包含含有CAR的免疫的组合物可以与抗炎剂一起给予。抗炎剂或药物包括但不限于类固醇和糖皮质激素 (包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安奈德)、非甾体类抗炎药 (NSAIDs) (包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、来氟米特、抗TNF药物、环磷酰胺和霉酚酸酯。示例性NSAID包括布洛芬、萘普生、萘普生钠、Cox-2抑制剂和唾液酸盐。示例性镇痛药包括对乙酰氨基酚、羟考酮、盐酸丙氧芬的曲马多。示例性糖皮质激素包括可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松龙或泼尼松。示例性生物应答调节剂包括直接针对细胞表面标志物 (例如,CD4、CD5等) 的分子,细胞因子抑制剂例如TNF拮抗剂 (例如依那西普 (ENBREL<sup>®</sup>)、阿达木单抗 (HUMIRA<sup>®</sup>) 和英夫利昔单抗 (REMICADE<sup>®</sup>)), 趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物应答调节剂包括单克隆抗体以及重组形式的分子。示例性DMARD包括咪唑硫嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、青霉胺、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、羟化氯喹、金 (口服 (金诺芬) 和肌内) 和米诺环素。

[0161] 在某些实施例中,本文所述的组合物与细胞因子结合给药。如本文所用,“细胞因子”意指由一个细胞群释放的蛋白质,其作为细胞间介质作用于另外细胞。细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括生长激素,如人生长激素,N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体激素 (LH);肝脏生长因子 (HGF);纤维母细胞生长因子 (FGF);催乳素;胎盘催乳素;苗勒抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整合素;血小板生成素 (TPO);神经生长因子 (NGFs) 如NGF- $\beta$ ;血小板生长因子;转化生长因子 (TGFs) 如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ;胰岛素生长因

子I和II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素如干扰素- $\alpha$ 、 $\beta$ 、和- $\gamma$ ;集落刺激因子(CSF)如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL)如IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12;IL-15,肿瘤坏死因子如TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ ;和其他多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。如本文所用,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质,以及天然序列细胞因子的生物活性等价物。

[0162] 在一些方面,本发明包括以小于100pM的 $K_d$ 与DLL3结合的抗原结合分子。在一些实施例中,该抗原结合分子以小于10pM的 $K_d$ 结合。在其他实施例中,该抗原结合分子以小于5pM的 $K_d$ 结合。

[0163] 制备方法

[0164] 可以使用多种已知技术制备根据本发明的多核苷酸、多肽、载体、抗原结合分子、免疫细胞、组合物等。

[0165] 在本文所述的免疫细胞的体外操作或遗传修饰之前,可以从受试者获得细胞。在一些实施例中,免疫细胞包含T细胞。T细胞可以从许多来源获得,包括外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在某些实施例中,T细胞可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术(例如FICOLL™分离)从受试者收集的血液单位获得。细胞可优选地通过单采从个体的循环血液中获得。单采产物通常含有淋巴细胞(包括T细胞)、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞、和血小板。在某些实施例中,可以洗涤通过单采收集的细胞以除去血浆级分,并将其置于合适的缓冲液或培养基中用于后续处理。可以用PBS洗涤细胞。应当认识到的是,可以使用洗涤步骤,例如通过使用半自动流通式离心机-例如Cobe™ 2991细胞处理器,Baxter CytoMate™等。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液或含有或不含缓冲液的其它盐水溶液中。在某些实施例中,可以去除单采样品的不希望的组分。

[0166] 在某些实施例中,通过裂解红细胞和耗尽单核细胞从PBMC分离T细胞,例如,使用通过PERCOLL™梯度的离心。可以通过本领域已知的阳性或阴性选择技术进一步分离T细胞的特定子群,如CD28<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>和CD45RO<sup>+</sup>T细胞。例如,通过阴性选择富集T细胞群可以用针对阴性选择的细胞特有的表面标志物的抗体组合来实现。本文使用的一种方法是经由阴性磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4<sup>+</sup>细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。流式细胞术和细胞分选也可用于分离用于本发明的目的细胞群。

[0167] 可以直接使用PBMC用于使用本文所述的方法在免疫细胞情况下的遗传修饰(如CAR或TCR)。在某些实施例中,在分离PBMC后,可以进一步分离T淋巴细胞,并且可以在遗传修饰和/或扩增之前或之后将细胞毒性和辅助性T淋巴细胞分选为初始、记忆和效应T细胞亚群。

[0168] 在一些实施例中,通过鉴定与这些类型的CD8<sup>+</sup>细胞中的每一种相关的细胞表面抗原,将CD8<sup>+</sup>细胞进一步分选为初始、中枢记忆和效应细胞。在一些实施例中,中枢记忆T细胞的表型标志物的表达包括CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和CD127,并且对于颗粒酶B是阴性的。在一些实施例中,中枢记忆T细胞是CD45RO<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞。在一些实施例中,效应T

细胞对CD62L、CCR7、CD28和CD127是阴性的，对于颗粒酶B和穿孔素是阳性的。在某些实施例中，CD4<sup>+</sup>T细胞进一步分选为亚群。例如，通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群，可以将CD4<sup>+</sup>T辅助性细胞分选为初始、中枢记忆和效应细胞。

[0169] 免疫细胞，例如T细胞，可以在使用已知方法分离后进行遗传修饰，或者免疫细胞可以在进行遗传修饰之前在体外活化和扩增(或在祖细胞的情况下分化)。在另一个实施例中，免疫细胞，例如T细胞，用本文所述的嵌合抗原受体进行遗传修饰(例如，用包含一个或多个编码CAR的核苷酸序列的病毒载体转导)，然后在体外活化和/或扩增。用于激活和扩增T细胞的方法是本领域已知的，并且描述于例如美国专利号6,905,874；和美国专利号6,867,041；美国专利号6,797,514；和PCT WO 2012/079000，其内容通过引用整体并入本文。通常，此类方法包括在具有适当细胞因子例如IL-2的培养基中使PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂接触，例如抗CD3和抗CD28抗体，通常附着于珠子或其他表面。附着于相同珠子的抗CD3和抗CD28抗体充当“替代”抗原呈递细胞(APC)。一个例子是DynaBeads<sup>®</sup>系统，一种用于人T细胞生理激活的CD3/CD28激活剂/刺激系统。

[0170] 在其他实施例中，可以用饲养细胞和适当的抗体和细胞因子使用例如如下所述的那些的方法激活和刺激T细胞增殖：美国专利号6,040,177；美国专利号5,827,642；和WO 2012129514，其内容通过引用整体并入本文。

[0171] 用于制备本发明的构建体和工程化的免疫细胞的某些方法描述于PCT申请PCT/US 15/14520中，其内容通过引用整体并入本文。制备构建体和细胞的另外的方法可以在美国临时专利申请号62/244036中发现，其内容通过引用整体并入本文。

[0172] 应当认识到的是，PBMC可以进一步包括其他细胞毒性淋巴细胞，例如NK细胞或NKT细胞。携带如本文披露的嵌合受体的编码序列的表达载体可以引入人供体T细胞、NK细胞或NKT细胞的群。携带表达载体的成功转导的T细胞可以使用流式细胞术分选以分离CD3阳性T细胞，然后除了使用抗CD3抗体和IL-2或本文其他地方描述的本领域已知的其他方法的细胞激活外还进一步繁殖以增加这些表达CAR的T细胞的数量。使用标准程序用于冷藏保存表达CAR的T细胞，用于储存和/或制备用于在人受试者中使用。在一个实施例中，T细胞的体外转导、培养和/或扩增在不存在非人动物衍生产物(例如胎牛血清(fetal calf serum)和胎牛血清(fetal bovine serum))的情况下进行。

[0173] 为了克隆多核苷酸，可以将载体导入宿主细胞(分离的宿主细胞)中以允许载体自身复制，从而扩增其中含有的多核苷酸的拷贝。克隆载体可含有序列组分，这些序列组分通常包括但不限于复制起点、启动子序列、转录起始序列、增强子序列和选择标志物。这些元件可以由本领域普通技术人员适当选择。例如，可以选择复制起点以促进载体在宿主细胞中的自主复制。

[0174] 在某些实施例中，本披露提供了含有本文提供的载体的分离的宿主细胞。含有载体的宿主细胞可用于表达或克隆载体中含有的多核苷酸。合适的宿主细胞可包括但不限于原核细胞、真菌细胞、酵母细胞或更高等真核细胞，如哺乳动物细胞。用于此目的的合适的原核细胞包括但不限于真细菌，例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物，例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae)像埃希氏杆菌属(Escherichia)，例如大肠杆菌(E.coli)、肠杆菌属(Enterobacter)、欧文氏菌属(Erwinia)、克雷白氏杆菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、沙门氏菌属(Salmonella)，例如鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、

沙雷氏菌属 (*Serratia*), 例如如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、和志贺氏杆菌 (*Shigella*)、还有芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 例如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (如铜绿假单胞菌)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。

[0175] 可以使用本领域已知的任何合适的方法将载体引入宿主细胞, 这些方法包括但不限于DEAE-葡聚糖介导的递送、磷酸钙沉淀法、阳离子脂质介导的递送、脂质体介导的转染、电穿孔、基因枪法、受体介导的基因递送、由聚赖氨酸、组蛋白、壳聚糖和肽介导的递送。用于表达目的载体的细胞的转染和转化的标准方法是本领域熟知的。在另外的实施例中, 不同表达载体的混合物可用于遗传修饰供体免疫效应细胞群, 其中每个载体编码如本文披露的不同CAR。得到的转导的免疫效应细胞形成混合的工程化的细胞群, 其中一部分工程化的细胞表达多于一种不同的CAR。

[0176] 在一个实施例中, 本发明提供了一种储存表达靶向DLL3蛋白的CAR或TCR的基因工程化的细胞的方法。这涉及冷藏保存免疫细胞, 使细胞在解冻后保持活力。表达CAR的一部分免疫细胞可以通过本领域已知的方法冷藏保存, 以提供此类细胞的永久来源, 用于将来治疗患有恶性肿瘤的患者。需要时, 冷藏保存的转化免疫细胞可以解冻、生长和扩增以获得更多此类细胞。

[0177] 如本文所用, “冷藏保存”是指通过冷却至零下的温度来保存细胞, 例如(通常) 77开尔文或 $-196^{\circ}\text{C}$  (液氮的沸点)。低温保护剂通常在零下的温度下使用, 以保护细胞免受因低温冷冻或升温至室温而受到损坏。冷藏保存剂和最佳冷却速率可以防止细胞损伤。根据本发明可以使用的低温保护剂包括但不限于: 二甲亚砜 (DMSO) (Lovelock&Bishop, Nature [自然] (1959); 183:1394-1395; Ashwood-Smith, Nature [自然] (1961); 190:1204-1205)、甘油、聚乙烯吡咯烷酮 (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci. [纽约科学院年报] (1960); 85:576)、和聚乙二醇 (Sloviter&Ravdin, Nature [自然] (1962); 196:48)。优选冷却速度为 $1^{\circ}\text{C}-3^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 。

[0178] 术语“基本上纯的”用于表示给定组分以高水平存在。该组分理想地是组合物中存在的主要组分。优选其以多于30%、多于50%、多于75%、多于90%、或甚至多于95%的水平存在, 所述水平关于正在考虑的总组合物以干重/干重进行确定。以非常高的水平(例如, 大于90%、大于95%或大于99%的水平)的该组分可被视为“纯的形式”。本发明的生物活性物质(包括多肽、核酸分子、抗原结合分子、部分)可以基本上不含一种或多种污染物的形式提供, 该物质可能以其他方式与之相关。当组合物实质上不含给定的污染物时, 污染物将处于很低的水平(例如, 以如上所述的干重/干重计小于10%、小于5%或小于1%的水平)。

[0179] 在一些实施例中, 通过首先从其培养基中收获细胞, 然后将细胞洗涤并浓缩在适于给药的培养基和容器系统(“药学上可接受的”载体)中以治疗有效量来配制细胞。合适的输注介质可以是任何等渗培养基配制品, 通常是生理盐水, Normosol™ R (Abbott) 或 Plasma-Lyte™ A (Baxter), 但也可以使用5%葡萄糖水溶液或林格氏乳酸盐。输注介质可以补充人血清白蛋白。

[0180] 组合物中所希望的治疗量的细胞通常为至少2个细胞(例如, 至少1个 $\text{CD8}^+$ 中枢记忆T细胞和至少1个 $\text{CD4}^+$ 辅助性T细胞亚群)或更通常大于 $10^2$ 个细胞, 并且高达 $10^6$ 个, 多达并且包括 $10^8$ 或 $10^9$ 个细胞, 并且可以超过 $10^{10}$ 个细胞。细胞数量取决于组合物所希望的用途,

以及其中包含的细胞类型。所希望的细胞的密度通常大于 $10^6$ 个细胞/ml,并且通常大于 $10^7$ 个细胞/ml,通常为 $10^8$ 个细胞/ml或更多。临床相关数量的免疫细胞可以分配到累积等于或超过 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、或 $10^{12}$ 个细胞的多次输注中。在本发明的一些方面,特别是因为所有输注的细胞将被重定向至特定的靶抗原(DLL3),可以给予较低数量的细胞,范围为 $10^6$ 个细胞/千克(每个患者 $10^6$ - $10^{11}$ )。CAR治疗可以在这些范围内的剂量下多次给药。对于在进行治疗的患者,该细胞可以是自体、同种异体或异源的。

[0181] 本发明的表达CAR的细胞群可以单独给予,或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分如IL-2或其他细胞因子或细胞群组合给予。本发明的药物组合物可包含表达CAR或TCR的细胞群,如本文所述的T细胞,与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合。此类组合物可包含缓冲液,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。优选将本发明的组合物配制为用于静脉内给药。

[0182] 药物组合物(溶液、悬浮液等)可包括下列中的一种或多种:无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、固定油,例如可用作溶剂或悬浮介质的合成的单甘油酯或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的试剂,如氯化钠或葡萄糖。胃肠外制剂可以被封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。可注射药物组合物优选是无菌的。

[0183] 应当认识到的是,通过用自杀基因转导免疫细胞(含有一种或多种CAR或TCR)可以使不良事件最小化。还可能需要将诱导型“开启”或“加速器”开关掺入免疫细胞中。合适的技术包括在用本发明的CAR构建体转导细胞之前、之后或同时使用诱导型胱天蛋白酶-9(美国申请2011/0286980)或胸苷激酶。用于引入自杀基因和/或“开启”开关的另外的方法包括TALENs、锌指、RNAi、siRNA、shRNA、反义技术和本领域已知的其他技术。

[0184] 应理解的是,本文的描述都只是示例性和说明性的,并且不限制如所要求的本发明。在本申请中,除非另外特别说明,单数的使用包括复数。

[0185] 在此使用的章节标题只是出于组织的目的,而不应解释为限制所描述的主题内容。在本申请中所引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、论文、书籍、和专著,都特此出于任何目的通过引用将其全部内容清楚地结合在此。如根据本披露使用的,除非另外指明,否则以下术语应当被理解为具有以下含义:

[0186] 在本申请中,“或”的使用意指“和/或”,除非另外说明。此外,术语“包括(including)”、以及其他形式如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用不是限制性的。同样,术语如“元件”或“组分”涵盖包含一个单位的元件和组分以及包含超过一个亚单位的元件和组分两者,除非另外明确说明。

[0187] 术语“DLL3活性”包括DLL3的任何生物学效应。在某些实施例中,DLL3活性包括DLL3与底物或受体相互作用或结合的能力。

[0188] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”或“核酸”包括单链和双链核苷酸聚合物。包含多核苷酸的核苷酸可以是核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸或任一类型核苷酸的修饰形式。所述修饰

包括碱基修饰(例如溴尿嘧啶核苷和肌苷衍生物)、核糖修饰(例如2',3'-双脱氧核糖)和核苷酸间连接修饰(例如硫代磷酸、二硫代磷酸、硒代磷酸、二硒代磷酸、阿尼洛硫代磷酸(phosphoro-anilothioate)、阿尼洛磷酸(phosphoraniladate)和磷酰胺)。

[0189] 术语“寡核苷酸”是指包含200个或更少核苷酸的多核苷酸。寡核苷酸可以是单链或双链的,例如用于构建突变基因。寡核苷酸可以是正义或反义寡核苷酸。寡核苷酸可包括用于检测测定的标记,包括放射性标记、荧光标记、半抗原或抗原标记。寡核苷酸可用作例如PCR引物、克隆引物或杂交探针。

[0190] 术语“控制序列”是指可以影响与其连接的编码序列的表达和加工的多核苷酸序列。此类控制序列的性质可取决于宿主生物体。在具体的实施例中,原核生物的控制序列可包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。例如,真核生物的控制序列可包括启动子,其包含转录因子、转录增强子序列和转录终止序列的一个或多个识别位点。“控制序列”可包括前导序列(信号肽)和/或融合伴侣序列。

[0191] 如本文所用,“可操作地连接”意指应用该术语的组分处于允许它们在合适条件下实现其固有功能的关系中。

[0192] 术语“载体”意指用于将蛋白质编码信息转移到宿主细胞中的任何分子或实体(例如,核酸、质粒、噬菌体或病毒)。术语“表达载体”或“表达构建体”是指适合转化宿主细胞的载体,并含有指导和/或控制(与宿主细胞结合)一个或多个与其可操作地连接的异源编码区表达的核酸序列。表达构建体可包括但不限于影响或控制转录、翻译的序列,并且如果存在内含子,则影响与其可操作地连接的编码区的RNA剪接。

[0193] 术语“宿主细胞”是指已经用核酸序列转化或能够被转化的细胞,从而表达目的基因。该术语包括亲本细胞的后代,无论后代是否与原始亲本细胞在形态上或遗传构成方面相同,只要存在目的基因即可。

[0194] 术语“转化”是指细胞遗传特性的改变,当细胞被修饰以含有新的DNA或RNA时,则该细胞就被转化了。例如,细胞经由转染、转导或其他技术引入新的遗传材料,由其原始状态进行基因修饰,则该细胞就被转化了。转染或转导后,转化的DNA可以通过物理整合进入细胞染色体与细胞的DNA重组,或者可以作为一个不被复制的游离元件被暂时维持,或者可以作为质粒独立复制。当转化的DNA随着细胞的分裂而复制时,细胞被认为已经“稳定地转化”了。

[0195] 术语“转染”是指通过细胞吸收外来或外源性DNA。许多转染技术在本领域中是熟知的,并在本文中披露。参见例如Graham等人,1973,Virology[病毒学]52:456;Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],同上;Davis等人,1986,Basic Methods in Molecular Biology[分子生物学基本方法],思唯尔(Elsevier);Chu等人,1981,Gene[基因]13:197。

[0196] 术语“转导”是指外来DNA经由病毒载体被引入细胞的过程。参见Jones等人,(1998).Genetics:principles and analysis.[遗传学:原理与分析。]波士顿:Jones&Bartlett Publ.[Jones&Bartlett出版社]。

[0197] 术语“多肽”或“蛋白质”是指具有蛋白质的氨基酸序列的大分子,其包括天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代。术语“多肽”和“蛋白质”特别涵盖DLL3抗原结合分子、抗体或抗原结合蛋白的一个或多个氨基酸被缺失、添加和/或取代的序列。术语“多

肽片段”是指与全长天然蛋白质相比具有氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失的多肽。与天然蛋白质相比,此类片段还可含有修饰的氨基酸。有用的多肽片段包括抗原结合分子的免疫功能片段。有用的片段包括但不限于一个或多个CDR区、重链和/或轻链的可变结构域、抗体链的其他部分的一部分等。

[0198] 术语“分离的”是指(i)不含至少一些通常与其一起被发现的蛋白质,(ii)基本上不含来自相同来源的其他蛋白质,例如来自相同物种,(iii)与至少约50%的在自然界与其相关的多核苷酸、脂质、碳水化合物或其他物质分离,(iv)可操作地与在自然界与其不相关的多肽相关(通过共价或非共价相互作用),或(v)在自然界中不存在。

[0199] 多肽的“变体”(如抗原结合分子或抗体)包含氨基酸序列,其中相对于另一个多肽序列,该氨基酸序列中插入、缺失和/或取代一个或多个氨基酸残基到。变体包括融合蛋白。

[0200] 术语“同一性”意指两个或更多个多肽分子或两个或更多个核酸分子的序列之间的通过比对和比较序列来确定的关系。“百分比同一性”意指比较的分子中氨基酸或核苷酸之间相同残基的百分比,并且是基于比较的最小分子的大小来计算的。在这些计算中,优选通过特定的数学模型或计算机程序(即“算法”)解决的空位比对(如果有的话)。

[0201] 为了计算百分比同一性,被比较的序列通常以给出序列之间最大匹配的方式比对。可用于确定百分比同一性的计算机程序的一个实例是GCG程序包,其包括GAP(Devereux等人,1984,Nucl. Acid Res. [核酸研究]12:387;Genetics Computer Group,University of Wisconsin, Madison, Wis. [遗传学计算机组,威斯康星大学,麦迪逊,威斯康星州])。计算机算法GAP是用来比对其百分比序列同一性待确定的两个多肽或多核苷酸。比对序列以使它们各自的氨基酸或核苷酸达到最佳匹配(提供算法确定的“匹配范围”)。在某些实施例中,本算法使用标准比较矩阵(参见Dayhoff等人,1978,Atlas of Protein Sequence and Structure [蛋白质序列和结构图谱]5:345-352用于PAM 250比较矩阵;Henikoff等人,1992,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. [美国国家科学院院刊]89:10915-10919用于BLOSUM 62比较矩阵)。

[0202] 如本文所用,二十种常规(如天然存在的)氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见Immunology-A Synthesis [免疫学-合成](第2版,Golub和Gren编辑,席娜欧出版公司(Sinauer Assoc.), 桑德兰,Mass. (1991)),出于任何目的将其通过引用结合在此。二十种常规氨基酸的立体异构体(如D-氨基酸)、 $\alpha$ -, $\alpha$ -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸等非天然氨基酸以及其他非常规氨基酸也可作为本发明多肽的合适组分。非常规氨基酸的实例包括:4-羟基脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸、 $\epsilon$ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 $\epsilon$ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 $\sigma$ -N-甲基精氨酸、和其他类似的氨基酸和亚氨基酸(例如,4-羟基脯氨酸)。本文使用的多肽表示法中,按照标准用法和惯例,左手方向是氨基末端方向,右手方向是羧基末端方向。

[0203] 保守氨基酸取代可以涵盖非天然存在的氨基酸残基,这些残基通常是通过化学肽合成而非生物系统合成而掺入。这些包括肽模拟物和氨基酸部分的其他反向或逆向形式。基于共同的侧链特性可以将天然存在的残基分类:

[0204] a) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0205] b) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0206] c) 酸性:Asp、Glu;

[0207] d) 碱性:His、Lys、Arg;

[0208] e) 影响链取向的残基:Gly、Pro;以及

[0209] f) 芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0210] 例如,非保守取代可以涉及到用这些类之一的成员交换另一个类中的成员。例如,此类被取代的残基可以被引入至与非人抗体同源的人抗体的区域,或者引入至分子的非同源区域。

[0211] 在改变抗原结合分子、工程化的T细胞的共刺激结构域或激活结构域时,可根据某些实施例考虑氨基酸的亲水指数。根据每种氨基酸的疏水性和荷电特性,确定了其亲水指数。它们是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);蛋氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。参见Kyte等人, J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],157:105-131(1982)。已知某些氨基酸可以取代具有相似亲水指数或得分的其他氨基酸,并且仍然保留相似的生物活性。本领域还应理解,可以基于亲水性有效地进行相似氨基酸的取代,特别是在由此产生的生物学功能蛋白质或肽旨在用于如在本发明的情况中的免疫学实施例时。示例性氨基酸取代在表2中列出。

[0212] 表2

	<u>原始残基</u>	<u>示例性取代</u>	<u>优选的取代</u>
[0213]	Ala	Val、Leu、Ile	Val

[0214]

Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser、Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro、Ala	Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe、 正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸、Ile、Val、Met、 Ala、Phe	Ile
Lys	Arg、1,4 二氨基-丁酸、 Gln、Asn	Arg
Met	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、 Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr、Ala、Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr、Phe	Tyr
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val	Ile、Met、Leu、Phe、 Ala、正亮氨酸	Leu

[0215] 术语“衍生物”意指包括除了氨基酸(或核酸)的插入、缺失或置换以外的化学修饰的分子。在某些实施例中,衍生物包含共价修饰,包括但不限于与聚合物、脂类或其他有机或无机部分的化学键合。在某些实施例中,经化学修饰的抗原结合分子比未经化学修饰的

抗原结合分子具有更大的循环半衰期。在一些实施例中,将衍生物抗原结合分子共价修饰使其包括一个或多个水溶性聚合物附着体,包括但不限于聚乙二醇、聚氧乙烯二醇或聚氧丙烯二醇。

[0216] 肽类似物在医药工业中作为非肽类药物被广泛应用,其性质与模板肽类似。这些类型的非肽化合物被称为“肽的模拟物(peptide mimetics)”或“肽模拟物(peptidomimetics)”。Fauchere, J., *Adv. Drug Res.* [药物研究前沿], 15:29 (1986); Veber & Freidinger, *TINS* [神经科学发展], 第392页 (1985); 以及 Evans 等人, *J. Med. Chem.* [药物化学期刊], 30:1229 (1987), 出于任何目的将其通过引用结合在此。

[0217] 术语“治疗有效量”意指确定在哺乳动物体内产生治疗应答的DLL3抗原结合分子的量。此类治疗有效量是本领域普通技术人员很容易确定的。

[0218] 术语“患者”和“受试者”可互换地使用,并包括人和非人动物受试者,以及那些具有正式诊断的障碍的受试者、那些没有正式确认的障碍的受试者、那些接受医疗救助的受试者、那些有发育障碍风险的受试者等。

[0219] 术语“治疗”和“治疗”包括治疗性治疗、预防性治疗,以及应用于降低受试者罹患障碍或其他危险因素的风险。治疗不需要障碍的完全治愈,并涵盖减少症状或潜在危险因素的实施例。术语“预防”并不要求100%事件消除的可能性。相反,它表示在化合物或方法存在的情况下,事件发生的可能性已经降低。

[0220] 标准技术可用于重组DNA、寡核苷酸合成、以及组织培养和转化(如电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书进行,或如本领域中通常所实现或如在此所描述进行的。前述技术和方法一般是根据本领域中众所周知的常规方法并且如本说明书全篇所引用并且论述的不同通用和更特定的参考文献中所描述来进行。参见例如, Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [分子克隆: 实验室手册] (第2版, 冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港 (Cold Spring Harbor), 纽约州 (1989)), 出于任何目的将其通过引用结合在此。

[0221] 如下序列将进一步说明本发明。

[0222] CD28T DNA细胞外、跨膜、细胞内

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGC  
ACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGT  
TGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGG

[0223] CTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCG  
ATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTAC  
CAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTCGCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID  
NO:1)

[0224] CD28T细胞外、跨膜、细胞内AA:

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP FWVLVVVGGV LACYSLLVTV

[0225] AFIFWVRSK RSLLHSDYM NMPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAYS  
(SEQ ID NO:2)

- [0226] CD28T DNA-细胞外  
CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGC
- [0227] ACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA (SEQ ID NO:3)
- [0228] CD28T AA-细胞外
- [0229] LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEQ ID NO:4)
- [0230] CD28 DNA跨膜结构域  
TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTC
- [0231] GTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGT (SEQ ID NO:5)
- [0232] CD28 AA跨膜结构域:
- [0233] FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIIFWV (SEQ ID NO:6)
- [0234] CD28 DNA细胞内结构域:  
AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCC
- [0235] ACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTA  
GAGATTTGCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID NO:7)
- [0236] CD28 AA细胞内结构域
- [0237] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:8)
- [0238] CD3 $\xi$ DNA  
AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCA
- [0239] GAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGAC  
GTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAA  
GACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAA  
GATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGG  
GGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGG  
ATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO:9)
- [0240] CD3 $\xi$ AA  
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR
- [0241] RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  
YDALHMQALPPR (SEQ ID NO:10)
- [0242] CD28 DNA  
ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGG
- [0243] TACCATCATTACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTTCCC  
CGGGCCATCAAAGCCC (SEQ ID NO:11)
- [0244] CD28 AA
- [0245] IEVMYPPPYL DNEKSNGTII HVKKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEQ ID NO:12)
- [0246] CD8 DNA细胞外&跨膜结构域

- [0247] GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTG  
TTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCA  
GCTCCTACCATCGCTTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGA  
CCGGCCGCAGGGGGCGCTGTTCATAACCAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGA  
TATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTC  
CCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAAC (SEQ ID NO:13)
- [0248] CD8 AA细胞外&跨膜结构域  
AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG  
GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:14)
- [0249] 4-1BB DNA细胞内结构域  
CGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGAGAAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAA  
ACAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAGGACGGCTGC
- [0250] TCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAGT (SEQ ID  
NO:15)
- [0251] 4-1BB AA细胞内结构域  
RFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID
- [0252] NO:16)
- [0253] 克隆1H2.1 HC DNA  
CAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCGGTCTGGTGAAGCCCTCAGAAA  
CGCTCTCCCTCACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTTTCATATTACT  
GGACGTGGATCAGGCAGCCTCCCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGATA  
TATCTACTATAGTGGCACCCTAACTATAATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGT
- [0254] GACAATCTCTGTTGACACCTCCAAGAGCCAGTTCAGCCTGAACTCTCCA  
GTGTGACAGCCGCCGATACAGCCGTGTATTACTGTGCCTCTATCGCTGTGC  
GCGGGTTCTTTTTTIGATTATTGGGGCCAGGGGACACTGGTGACCGTTAGC  
AGC (SEQ ID NO:40)
- [0255] 克隆1H2.1 HC AA-CDR加下划线  
QVQLQESGPELVKPSSETLSLTCTVSGDSISSYYWTWIRQPPGKGLEWIGYIYY  
SGTTNYPNPSLKS~~SRVTISVDTSK~~SQFSLKLSSVTAADTAVYYCASI~~AVRGFFFD~~  
YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41)
- [0256] 克隆1H2.1 HC AA CDR1:SYWWT (SEQ ID NO:42)
- [0257] 克隆1H2.1 HC AA CDR2:YIYSGTTNYPNPSLKS (SEQ ID NO:43)
- [0258] 克隆1H2.1 HC AA CDR3:I~~AVRGFFFDY~~ (SEQ ID NO:44)
- [0259] 克隆1H2.1 LC DNA

- GAAATTGTACTGACCCAGTCCCCGGCACGCTCTCTCTCTCCCCAGGGGA  
 AAGGGCAACCCTTAGCTGCCGGGCGAGCCAGAGCGTGAGTTCCTCCTACC  
 TCGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCTCCAGACTGCTGATTTAC  
 [0260] GGGGCTTCTACGAGAGCCACCGGCATACCTGATAGGTTCTCTGGCTCCGG  
 GTCTGGGACCGACTTTACTCTTACAATCAGCAGACTTGAGCCTGAAGACT  
 TCGCTGTGTATTATTGTCAACAATACGGAACGTCCCCCCTTACCTTTGGTG  
 GCGGGACAAAAGTGGAAATTAAGAGG (SEQ ID NO:45)
- [0261] 克隆1H2.1 LC AA (CDR加下划线)  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
- [0262] RATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPLTTFGGGTKVEIK  
 R (SEQ ID NO:46)
- [0263] 克隆1H2.1 LC CDR1 AA:RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:47)
- [0264] 克隆1H2.1 LC CDR2 AA:GASTRAT (SEQ ID NO:48)
- [0265] 克隆1H2.1 LC CDR3 AA:QQYGTSP (SEQ ID NO:49)
- [0266] 克隆8D2 HC DNA  
 CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTGCAAGCGTGAA  
 GGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGGTACTATATGCACTGGGTTCG  
 GCAGGCGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCAAACTCTGGCG  
 [0267] ATACAAATTACGCACAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACGATGACTCGAGACACTTCC  
 ATATCCACCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGACACTGCTGTCTAT  
 TACTGTGCAAGGGATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAATGGATGTCTGGGC  
 CCAGGGTACTACCGTCACGGTGTCTTCT (SEQ ID NO:50)
- [0268] 克隆8D2 HC AA (CDR加下划线)  
 QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPNSG
- [0269] DTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEVNRLRSDDTAVYYCARDPNRRSWYYGMDVW  
 AQGTTVTVSS (SEQ ID NO:51)
- [0270] 克隆8D2 HC AA CDR1:GYMH (SEQ ID NO:52)
- [0271] 克隆8D2 HC AA CDR2:WIDPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:53)
- [0272] 克隆8D2 HC AA CDR3:DPNRRSWYYGMDV (SEQ ID NO:54)
- [0273] 克隆8D2 LC DNA

- CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTGCAAGCGTGAA  
GGTGTCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGGTACTATATGCACTGGGTTCG  
GCAGGCGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTGGATTGATCCAACTCTGGCG  
ATACAAATTACGCACAGAAATTCAGGGCCGCGTGACGATGACTCGAGACACTTCC  
ATATCCACCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGACACTGCTGTCTAT  
TACTGTGCAAGGGATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAATGGATGTCTGGGC  
[0274] CCAGGGTACTACCGTCACGGTGTCTTCTGGCGGCGGGGGCTCAGGAGGAGGAGGCA  
GCGGTGGAGGAGGCAGCGATATTCAGATGACACAAAGCCCTTCTAGTCTCTCCGCA  
AGCGTTGGCGACCGCGTGACCATTACGTGTCAGGCTTACAAGATATTCGAACTAC  
CTGAACCTGGTATCAGCAGAAGCCCAGCAAGCACCTAAGCTGCTGATTTATGACGCT  
AGCAACCTTGAGACTGGCGTCCCCTCCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCAGGCACCGAC  
TTTACTTTTACCATCTCCACACTCCAGCCAGAAGATATTGCAACGTATTACTGCCAAC  
ATTATGATAACCTGCCTTTGACCTTCGGAGGTGGCACCAAGGTAGAGATCAGAAGA  
(SEQ ID NO:55)
- [0275] 克隆8D2 LC AA (CDR加下划线)
- [0276] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS  
RFSGSGSGTDFTFTISTLQPEDIATYYCQHYDNLPLTFGGGTKVEIRR (SEQ ID NO:56)
- [0277] 克隆8D2 LC AA CDR1:QASQDIRNYLN (SEQ ID NO:57)
- [0278] 克隆8D2 LC AA CDR2:DASNLET (SEQ ID NO:58)
- [0279] 克隆8D2 LHC AA CDR3:QHYDNLPLTF (SEQ ID NO:59)
- [0280] 克隆6B2 HC DNA
- CAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCAGGCGCTAGCGTCAA  
AGTGAGCTGTAAGGCCTCAGGTTACACGTTTACTGGGTACTATATGCATTGGGTGAG  
GCAAGCCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTGGATTAATCCTAACAGCGGGG  
[0281] ACACAAGCTATGCCAACGCTTCTGGGCAGAGTAACAATGACACGGGATACAAGT  
ATTAACACCGTCCATATGGAACCTCTCTCGGCTCGGCTCAGATGATACCGCGGTTTAT  
TACTGTGCTAGGGAGGACGACTCCTCTTGGTATGGCAGCTTCGATTATTGGGGGCAG  
GGAACCCTGGTGACAGTCTCATCT (SEQ ID NO:60)
- [0282] 克隆6B2 HC AA (CDR加下划线)
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG
- [0283] DTSYAQRFLGRVTMTRDTSINTVHMELSRLGSDDTAVYYCAREDDSSWYGSFDYWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO:61)
- [0284] 克隆6B2 HC AA CDR1:GYMH (SEQ ID NO:62)
- [0285] 克隆6B2 HC AA CDR2:WINPNSGDTSYAQRFLG (SEQ ID NO:63)
- [0286] 克隆6B2 HC AA CDR3:EDDSSWYGSFDY (SEQ ID NO:64)
- [0287] 克隆6B2 LC DNA

- [0288] GATATACAGATGACTCAGAGTCCCTCAAGCTTGAGTGCCAGTGTAGGCGACCGGGT  
GACGATAACCTGTAGGGCTTCACAGGGAATCAGAAATTATCTGGGTTGGTACCAGC  
AGAAGCCAGGAAAGGCACCTAAAAGACTTATTTACGCCGCATCCTCCTTGCAGTCC  
GGCGTGCCATCAAATTTTCTGGGAGCGGCTCTGGAACCGAGTTCACCCTCACGATC  
TCCAGCCTCCAGCCCGAGGACTTTGCCACCTACTATTGCCTGCAGCACGATAGTGAT  
CTGCGAACTTTTGGGCAAGGCACTAAAGTGGAATTAAGAGA (SEQ ID NO:65)
- [0289] 克隆6B2 LC AA (CDR加下划线)
- [0290] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS  
KFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLOHDSDLRTEFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:66)
- [0291] 克隆6B2 LC AA CDR1:RASQGIRNYLG (SEQ ID NO:67)
- [0292] 克隆6B2 LC AA CDR2:AASSLQS (SEQ ID NO:68)
- [0293] 克隆6B2 LC AA CDR3:LQHDSDLRTE (SEQ ID NO:69)
- [0294] 构建体1H2.14-1BB DNA (信号序列以粗体显示)
- ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC**  
**GCACGCCCGCAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCGGTCTGGTGAAGCCCTCAG**  
AAACGCTCTCCCTCACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTCTTCATATTACTGGAC  
GTGGATCAGGCAGCCTCCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGATATATCTACTATA  
GTGGCACCCTAACTATAATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGTGACAATCTCTGTTGACA  
CCTCCAAGAGCCAGTTCAGCCTGAAACTCTCCAGTGTGACAGCCGCCGATACAGCC  
GTGTATTACTGTGCCTCTATCGCTGTGCGCGGGTTCTTTTTTGATTATTGGGGCCAGG  
GGACACTGGTGACCGTTAGCAGCGGGGGAGGAGGGTCCGGTGGCGGCGGCAGCGG  
AGGCGGGGGTTCAGAAATTGTACTGACCCAGTCCCCCGGCACGCTCTCTCTCCCC  
AGGGGAAAGGGCAACCCTTAGCTGCCGGGCGAGCCAGAGCGTGAGTTCCTCCTACC  
TCGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATTTACGGGGCTT

- CTACGAGAGCCACCGGCATACCTGATAGGTTCTCTGGCTCCGGGTCTGGGACCGACT  
TTACTCTTACAATCAGCAGACTTGAGCCTGAAGACTTCGCTGTGTATTATTGTCAAC  
AATACGGAACGTCCCCCTTACCTTTGGTGGCGGGACAAAAGTGGAATTAAGAGG  
GCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACAGTGAAGGGCAA  
GCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTC  
GTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCT  
TCTGGGTTCGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTCA  
[0296] AACAGCCGTTTATGAGGCCGTCAAACGACTCAGGAAGAAGACGGCTGCTCCTGC  
CGCTTTCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTGAGGGTGAAGTTTCCAGATC  
TGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACC  
TGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAG  
ATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCA  
GAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGA  
AGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATAC  
TTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO:17)
- [0297] 构建体1H2.14-1BB AA (信号序列以粗体显示;CDR加下划线)  
**MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQESGPELVKPSSETLSLTCTVSGDSISSYYWTWI**  
**RQPPGKGLEWIGYIYYSGTTNYPNPSLKSRTISVDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCAS**  
**IAVRGFFFDYWQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCR**  
**ASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFA**  
VYYCQYGTSPFTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVW  
[0298] LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRFVSVVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC  
RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPENM  
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA  
LHMQUALPPR (SEQ ID NO:18)
- [0299] 构建体1H2.1 CD28T DNA (信号序列以粗体显示)  
**ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC**  
**GCACGCCCGCAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCGGTCTGGTGAAGCCCTCAG**  
**AAACGCTCTCCCTCACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTCTTCATATACTGGAC**  
GTGGATCAGGCAGCCTCCCGCAAGGACTGGAGTGGATCGGATATATCTACTATA  
[0300] GTGGCACCCTAACTATAATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGTGACAATCTCTGTTGACA  
CCTCCAAGAGCCAGTTCAGCCTGAAACTCTCCAGTGTGACAGCCGCCGATACAGCC  
GTGTATACTGTGCCTCTATCGCTGTGCGCGGGTCTTTTTTTGATTATTGGGGCCAGG  
GGCACTGGTGACCGTTAGCAGCGGGGGAGGAGGGTCCGGTGGCGGGCGGCAGCGG

AGGCGGGGTTTCAGAAATTGTA CTGACCCAGTCCCCGGCACGCTCTCTCTCCCC  
AGGGGAAAGGGCAACCCTTAGCTGCCGGGCGAGCCAGAGCGTGAGTTCCTCTACC  
TCGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATTTACGGGGCTT  
CTACGAGAGCCACCGGCATACCTGATAGGTTCTCTGGCTCCGGGTCTGGGACCGACT  
TTACTCTTACAATCAGCAGACTTGAGCCTGAAGACTTCGCTGTGTATTATTGTCAAC  
AATACGGAACGTCCCCCTTACCTTTGGTGGCGGGACAAAAGTGGA AATTAAGAGG  
GCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAA  
GCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTC  
GTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCT  
TCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTC  
CACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT  
TTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGA AATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTAT  
CAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGCAGAGAAGAGTA  
CGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAA  
GGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAG  
GCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATG  
GCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATG  
CAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:19)

[0301] 构建体1H2.1 CD28T AA (信号序列以粗体显示;CDR加下划线)

**MALPVTALLLPLALLLHAARP**QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSYYWTWI  
RQPPGKLEWIGYIYYSGTTNYNPSLKS RVTISVDTSK SQFSLKLSVTAADTAVYYCAS  
IAVRGFFFDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPG TLSLSPGERATLSCR  
ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPDRFSGSGS GTFDLTISRLEPEDFA  
VYYCQQYGTSP LTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWV  
LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHSYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRD  
FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRR  
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ  
ALPPR (SEQ ID NO:20)

[0302] 构建体8D2 4-1BB DNA (信号序列以粗体显示)

**ATGGCACTCCCCGTA**ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
**GCACGCCCCG**CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTG  
CAAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGGTACTATATGC  
ACTGGGTTCCGGCAGGC GCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCA  
AACTCTGGCGATACAAATTACGCACAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACGATGACTCG

AGACACTTCCATATCCACCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGACAC  
TGCTGTCTATTACTGTGCAAGGGATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAATGGA  
TGTCTGGGCCAGGGTACTACCGTCACGGTGTCTTCTGGCGCGGGGGCTCAGGAGG  
AGGAGGCAGCGGTGGAGGAGGCAGCGATATTCAGATGACACAAAGCCCTTCTAGTC  
TCTCCGCAAGCGTTGGCGACCGCGTGACCATTACGTGTCAGGCTTACAAGATATTC  
GAAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCACCTAAGCTGCTGATT  
TATGACGCTAGCAACCTTGAGACTGGCGTCCCCTCCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCA  
GGCACCGACTTTACTTTTACCATCTCCACACTCCAGCCAGAAGATATTGCAACGTAT  
TACTGCCAACATTATGATAACCTGCCTTTGACCTTCGGAGGTGGCACCAAGGTAGAG  
ATCAGAAGAGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGT  
GAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTG  
[0306] GGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCT  
TTTATAATCTTCTGGGTTTCGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGAGAAAAAAGCTGCTG  
TACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAAGACGG  
CTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCAACTGAGGGTGAAGT  
TTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAAC  
GAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACG  
GGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATA  
ATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGA  
GAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTAC  
GAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID  
NO:21)

[0307] 构建体8D2 4-1BB AA (信号序列以粗体显示)

**MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTGYMH**  
WVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGDTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEVNRLRSDDTA  
VYYCARDPNRRSWYYGMDVWAQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLS  
ASVGDRVTITCQASQDIRNYLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF

[0308] TFTISTLQPEDIATYYCQHYDNLPLTFGGGTKVEIRRAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP  
PLFPGPSKPFWLVVVGGLVACYSLLVTVAIFWVRFVVKRGRKLLYIFKQPFMRPV  
QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLQY  
GLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:22)

[0309] 构建体8D2 CD28T DNA (信号序列以粗体显示)

**ATGGCACTCCCCGTA**ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
**GCACGCCCGC**AGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTG  
 CAAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTACTGGGTACTATATGC  
 ACTGGGTTTCGGCAGGCGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCA  
 AACTCTGGCGATACAAATTACGCACAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACGATGACTCG  
 AGACACTTCCATATCCACCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGACAC  
 TGCTGTCTATTACTGTGCAAGGGATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAATGGA  
 TGTCTGGGCCAGGGTACTACCGTCACGGTGTCTTCTGGCGGCGGGGGCTCAGGAGG  
 AGGAGGCAGCGGTGGAGGAGGCAGCGATATTCAGATGACACAAAGCCCTTCTAGTC  
 TCTCCGCAAGCGTTGGCGACCGCGTGACCATTACGTGTCAGGCTTCAACAAGATATTC  
 GAAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCACCTAAGCTGCTGATT  
 TATGACGCTAGCAACCTTGAGACTGGCGTCCCCTCCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCA  
 GGCACCGACTTTACTTTTACCATCTCCCACTCCAGCCAGAAGATATTGCAACGTAT  
 TACTGCCAACATTATGATAACCTGCCTTTGACCTTCGGAGGTGGCACCAAGGTAGAG  
 ATCAGAAGAGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGT  
 GAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTG  
 GGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCT  
 TTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATG  
 AATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACC  
 ACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGC  
 TCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGCA  
 GAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGG  
 AAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACA  
 AAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAA  
 GGGTCACGATGGCTTGATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACG  
 CCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:23)

[0310] 构建体8D2 CD28T AA (信号序列以粗体显示)

**MALPVTALLLPLALLHAARP**QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKKASGYTFTGYMH  
 WVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGDTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEVNRLRSDDTA  
 VYYCARDPNRRSWYYGMDVWAQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS  
 ASVGDRVTITCQASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF  
 TFTISTLQPEDIATYYCQHYDNLPLTFGGGTKVEIRRAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP  
 S  
 PLFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRP  
 GPT  
 RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
 DKRR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTA  
 TKDITYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:24)

[0311] 构建体6B2 CD28T DNA (信号序列以粗体显示)

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
**GCACGCCCGCAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCAGGCG**  
 CTAGCGTCAAAGTGAGCTGTAAGGCCTCAGGTTACACGTTTACTGGGTAATATATGC  
 ATTGGGTCAGGCAAGCCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTGGATTAATCCT  
 AACAGCGGGGACACAAGCTATGCCCAACGCTTCCTGGGCAGAGTAACAATGACACG  
 GGATAACAAGTATTAACACCGTCCATATGGAAGTCTCTCGGCTCGGCTCAGATGATAC  
 CGCGGTTTATTACTGTGCTAGGGAGGACGACTCCTCTTGGTATGGCAGCTTCGATTA  
 TTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGCAGTCTCATCTGGTGGAGGGGGCTCCGGGGGGTG  
 GGGGCAGCGGAGGGGGAGGTTCTGATATACAGATGACTCAGAGTCCCTCAAGCTTG  
 AGTGCCAGTGTAGGCGACCGGGTGACGATAACCTGTAGGGCTTCACAGGGAATCAG  
 AAATTATCTGGGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCACCTAAAAGACTTATTT  
 ACGCCGCATCCTCCTTGCAGTCCGGCGTGCCATCAAAATTTTCTGGGAGCGGCTCTG  
 GAACCGAGTTCACCCTCACGATCTCCAGCCTCCAGCCCAGGACTTTGCCACCTACT  
 ATTGCCTGCAGCACGATAGTGATCTGCGAACTTTTGGGCAAGGCACTAAAGTGGAA  
 ATTAAGAGAGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGT  
 GAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTACCCTTGTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTG  
 GGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCT  
 TTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATG  
 AATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACC  
 ACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGC  
 TCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGCA  
 GAGAAGAGTACGACGTTTTTGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGG  
 AAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACA  
 AAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAA  
 GGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACG  
 CCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:25)

[0314] 构建体6B2 CD28T AA (信号序列以粗体显示)

**MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMH**  
 [0315] WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTSYAQRFLGRVTMTRDTSINTVHMELSRLGSDDTA  
 [0316] VYYCAREDDSSWYGSFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLAS  
 VGDRVITICRASQGIRNYLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTEFTLT  
 ISSLPEDFATYYCLQHSDLRFTFGQGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP  
 FPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRK  
 [0317] HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK  
 DTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:26)

[0318] 构建体6B2 4-1BB DNA (信号序列以粗体显示)

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCC  
GCACGCCCGCAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCAGGCG  
CTAGCGTCAAAGTGAGCTGTAAGGCCTCAGGTTACACGTTTACTGGGTAATATATGC  
ATTGGGTCAGGCAAGCCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTGGATTAATCCT  
AACAGCGGGGACACAAGCTATGCCCAACGCTTCCTGGGCAGAGTAACAATGACACG  
GGATAACAAGTATTAACACCGTCCATATGGAAGTCTCTCGGCTCGGCTCAGATGATAC  
CGCGGTTTATTACTGTGCTAGGGAGGACGACTCCTCTTGGTATGGCAGCTTCGATTA  
TTGGGGGCAGGGAACCCCTGGTGACAGTCTCATCTGGTGGAGGGGGCTCCGGGGGTG  
GGGCAGCGGAGGGGGAGGTTCTGATATACAGATGACTCAGAGTCCCTCAAGCTTG  
AGTGCCAGTGTAGGCGACCGGGTGACGATAACCTGTAGGGCTTCACAGGGAATCAG  
AAATTATCTGGGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCACCTAAAAGACTTATTT  
ACGCCGCATCCTCCTTGCAGTCCGGCGTGCCATCAAAATTTTCTGGGAGCGGCTCTG  
GAACCGAGTTCACCCTCACGATCTCCAGCCTCCAGCCCGAGGACTTTGCCACCTACT  
[0319] ATTGCCTGCAGCACGATAGTATCTGCGAAGCTTTTGGGCAAGGCACTAAAGTGAA  
ATTAAGAGAGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGT  
GAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTG  
GGTGTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTGTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCT  
TTTATAATCTTCTGGGTTTCGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGGAGAAAAAAGCTGCTG  
TACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAAGACGG  
CTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAGTGGGGTGAAGT  
TTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAAC  
GAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACG  
GGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATA  
ATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGA  
GAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTAC  
GAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID  
NO:27)

[0320] 构建体6B2 4-1BB AA (信号序列以粗体显示)

**MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMH**  
WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTSYAQRFLGRVTMTRDTSINTVHMELSRLGSDDTA  
VYYCAREDDSSWYGSFDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS  
VGDRVITICRASQGIRNYLGWYQQKPKGAPKRLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTEFTLT

[0321] ISSLPEDFATYYCLQHSDLRTFGQGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPL  
FPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRFVSVVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ  
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL D  
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG  
LSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:28)

[0322] 人DLL3同种型1NM\_016941 AA (618个氨基酸)

- MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARL  
 PCRLFFRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRD  
 AWPGTFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFS  
 YRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGRLPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQ  
 PGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETP  
 [0323] RSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEK  
 RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEG  
 GGAHRCSCALGFGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEF  
 PVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLVHVRRRGHSQDA  
 GSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSVDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYA  
 REVATPLFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK (SEQ ID NO:29)
- [0324] 人DLL3同种型2NM\_203486AA (587个氨基酸)  
 MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARL  
 PCRLFFRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRD  
 AWPGTFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFS  
 YRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGRLPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQ  
 PGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETP  
 [0325] RSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEK  
 RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEG  
 GGAHRCSCALGFGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEF  
 PVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLVHVRRRGHSQDA  
 GSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSVDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYA  
 REA (SEQ ID NO:30)
- [0326] CAR信号肽DNA  
 ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGCA  
 [0327] CGCCCG (SEQ ID NO:31)
- [0328] CAR信号肽: MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:32) scFv G4S接头DNA  
 [0329] GGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCC (SEQ ID NO:33)
- [0330] scFv G4s接头: GGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO:34)  
 [0331] scFv惠特洛 (Whitlow) 接头DNA  
 GGGTCTACATCCGCTCCGGGAAGCCCGGAAGTGGCGAAGGTAGTACAAAGGGG  
 [0332] (SEQ ID NO:35)
- [0333] scFv惠特洛 (Whitlow) 接头: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:36)  
 [0334] 4-1BB核酸序列 (细胞内结构域)  
 AAGCGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCCGGTC  
 [0335] CAAACGACTCAGGAAGAAGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGG  
 CGGGTGCGAACTG (SEQ ID NO:37)

[0336] 4-1BB AA (细胞内结构域)

[0337] KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:38)

[0338] OX40 AA

[0339] RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:39)

[0340] 通过引用结合

[0341] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引入结合在此,如同每一单独的出版物、专利或专利申请具体且单独地通过引入结合在此。然而,在此的参考文献的引用不能理解为承认此类参考文献是本发明的现有技术。通过引用结合的参考文献中提供的任何定义或术语与本文提供的术语和讨论发生冲突的程度上,以为本术语和定义为准。

[0342] 等效物

[0343] 前述书面说明书被认为满足能使本领域技术人员实践本发明。本发明的某些优选实施例中详细描述了前述描述和实例并描述了诸位发明人考虑的最佳模式。然而,将领会到的是,不论前述事项可以在文中看起来如何详尽,本发明可以按多种方式进行实践,并且应该依据所附权利要求书及其任何等效物来解释。

[0344] 以下实例,包括进行的实验和实现的结果,仅提供解释说明目的,并且不应被解释为限制本发明。

[0345] 实例1

[0346] 使用含有不同CAR构建体的第三代慢病毒转移载体,以及ViraPower慢病毒包装混合物(生命技术公司(Life Technologies)),来生成慢病毒上清液。简言之,通过混合15 $\mu$ g的DNA和22.5 $\mu$ l的聚乙烯亚胺(波利塞斯公司(Polysciences),1mg/ml)于600 $\mu$ l的OptiMEM培养基中来产生转染混合物。将混合物在室温下孵育5分钟。同时,将293T细胞(ATCC)蛋白酶化、计数,将共计 $10 \times 10^6$ 个细胞以及转染混合物置于T75烧瓶中。转染后三天,收集上清液并通过0.45 $\mu$ m过滤器过滤并储存在-80 $^{\circ}$ C下直到使用。根据制造商的说明书,使用ficoll-paque密度离心法从健康供体leukopaks(Hemacare)中分离出PBMC。使用OKT3(50ng/ml,美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))于R10培养基+IL-2(300IU/ml, Proleukin<sup>®</sup>, Prometheus<sup>®</sup> 治疗诊断公司 (Prometheus<sup>®</sup> Therapeutics and Diagnostics))中刺激PBMC。刺激后48小时,使用慢病毒以MOI=10转导细胞。在用于活性测定前,细胞保持在 $0.5-2.0 \times 10^6$ 个细胞/ml。为检测CAR表达,在染色缓冲液(BD Pharmingen公司)中使用DLL3-Fc检测试剂(Amgen公司)或生物素化蛋白L(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))在4 $^{\circ}$ C下染色T细胞30分钟。洗涤细胞并在染色缓冲液中使用抗Fc-PE(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))或PE链霉亲和素(BD Pharmingen公司)在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。数据采集前,洗涤细胞并重悬于含有碘化丙啶(BD Pharmingen公司)的染色缓冲液中。来自健康供体的T细胞中的DLL3 CAR的表达如图1所示。每个框中的数字表示阳性群体的百分比。

[0347] 实例2

[0348] 为了检测慢病毒介导的DLL3 CAR T细胞的溶细胞活性,将效应细胞与靶细胞按1:1的E:T比在R10培养基中培养。共培养十六和四十小时后,通过Luminex(EMD密理博公司(EMD Millipore))分析上清液,并通过被CD3-阴性细胞吸收的碘化丙啶(PI)的流式细胞术评估靶细胞存活率。来自健康供体的慢病毒介导的CAR T细胞的平均溶细胞活性如图2所示

(EoL1细胞为对照,H82和EoL1-DLL3在表面表达DLL3),并且来自健康供体的CAR T细胞的细胞因子产生如图3所示。

[0349] 实例3

[0350] 为了评估对表达DLL3的靶细胞应答的CAR T细胞增殖,在R10培养基中以1:1的E:T比与靶细胞共培养前,用CFSE标记T细胞。五天后,通过CFSE稀释的流式细胞术评估T细胞增殖情况(图4)。DLL3 CAR T细胞的增殖情况如图5所示。

[0351] 实例4

[0352] 为了检测体内的抗肿瘤活性,产生了用于人SCLC的异源模型的DLL3 CAR T细胞。将荧光素酶标记的SHP-77细胞( $2 \times 10^6$ 个/动物)静脉内注射到5至6周龄的NSG雌性小鼠体内。6天后,静脉内注射 $6 \times 10^6$  T细胞(约50%CAR+)于200 $\mu$ l PBS中的溶液并使用生物发光成像每周测量动物的肿瘤负荷。如图6所示,注射DLL3 CAR T细胞显著降低了所有检测时间点的肿瘤负荷(nt=未转染对照;CAR1=1H2.1-C28T-CD28-CD3 $\zeta$ ;CAR2=1H2.1-C28T-4-1BB-CD3 $\zeta$ ;CAR3=1H2.1-C8k-CD28-CD3 $\zeta$ ;CAR4=1H2.1-C8k-4-1BB-CD3 $\zeta$ )。如图6所示,在存活分析(注射表达1H2-CD28T或1H2-4-1BB的CAR T细胞比接受模拟转导细胞的动物具有显著的存活优势)中进一步证实了这一点。

## 序列表

<110> 美商安进公司 (AMGEN INC.)

<120> DLL3的嵌合受体及其使用方法

<130> A-2249-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 62/655,725

<151> 2018-04-10

<160> 70

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 294

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

[0001]

<400> 1

cttgataatg aaaagtcaaa cggaacaatc attcacgtga agggcaagca cctctgtccg 60

tcacccttgt tccctgggtcc atccaagcca ttctgggtgt tggctgtagt gggtggagtc 120

ctcgtctgtt actctctgct cgtcaccgtg gcttttataa tcttctgggt tagatccaaa 180

agaagccgcc tgcctcatag cgattacatg aatatgactc cacgccgcc tgccccaca 240

aggaaacct accagcctta cgcaccacct agagatttcg ctgcctatcg gaggc 294

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 2

Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys  
1 5 10 15

His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp

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

[0002]

<210> 3  
 <211> 90  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 3  
 cttgataatg aaaagtcaaa cgaacaatc attcacgtga agggcaagca cctctgtccg 60  
 tcacccttgt tcctgtgcc atccaagcca 90

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 4  
 Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys  
 1 5 10 15  
 His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro  
 20 25 30

- <210> 5  
 <211> 81  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"
- <400> 5  
 ttctgggtgt tggtcgtagt gggtaggagtc ctcgcttggt actctctgct cgtcaccgtg 60  
 gcttttataa tcttctgggt t 81
- <210> 6  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"
- [0003] <400> 6  
 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  
 20 25
- <210> 7  
 <211> 123  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"
- <400> 7  
 agatcaaaaa gaagccgcct gtcctatagc gattacatga atatgactcc acgccgcct 60  
 ggccccacaa gaaacacta ccagccttac gcaccaccta gagatttcgc tgcctatcgg 120  
 agc 123
- <210> 8

<211> 41  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 8  
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
 1 5 10 15

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

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
 35 40

<210> 9  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0004] <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 9  
 aggggtgaagt tttccagatc tgcagatgca ccagcgtatc agcagggcca gaaccaactg 60  
 tataacgagc tcaacctggg acgcaggaa gagtatgacg ttttggacaa gcgcagagga 120  
 cgggaccctg agatgggtgg caaaccaaga cgaaaaaacc cccaggaggg tctctataat 180  
 gagctgcaga aggataagat ggctgaagcc tattctgaaa taggcatgaa aggagagcgg 240  
 agaaggggaa aagggcacga cggtttgtag cagggactca gcactgctac gaaggatact 300  
 tatgacgctc tccacatgca agccctgcca cctagg 336

<210> 10  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 10  
 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

[0005]

<210> 11  
 <211> 117  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的  
 多核苷酸"  
 <400> 11  
 attgaggtga tgtatccacc gccttacctg gataacgaaa agagtaacgg taccatcatt 60  
 cacgtgaaag gtaaacacct gtgtccttet ccctcttcc cgggccatc aaagccc 117  
 <210> 12  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的  
 多肽"  
 <400> 12

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn  
 1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu  
 20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro  
 35

<210> 13  
 <211> 288  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 13  
 gctgcagcat tgagcaactc aataatgtat tttagtcact ttgtaccagt gttcttgccg 60  
 gctaagccta ctaccacacc cgtccaacgg ccacctacc cagctcctac categettca 120  
 [0006] cagcctctgt ccctgcgccc agaggcttgc cgaccggccg cagggggcgc tgttcatacc 180  
 agaggactgg atttcgctg cgatatctat atctgggcac ccctggccgg aacctgcggc 240  
 gtactcctgc tgtccctggt catcacgetc tattgtaate acaggaac 288

<210> 14  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 14  
 Ala Ala Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro  
 1 5 10 15

Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
 20 25 30

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
 35 40 45

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
 50 55 60

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
 65 70 75 80

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn  
 85 90 95

<210> 15  
 <211> 141  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 15  
 cgcttttccg tcgtaagcg ggggagaaaa aagctgctgt acatittcaa acagccgttt 60  
 atgaggccgg tccaaacgac tcaggaagag gacggctgct cctgccgctt tctgaggag 120  
 [0007] gaggagggcg ggtgcgaact g 141

<210> 16  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 16  
 Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
 1 5 10 15

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
 20 25 30

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 35 40 45

<210> 17  
 <211> 1449

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"	
	<400> 17	
	atggcactcc ccgtaactgc tctgctgctg ccgttggcat tgctcctgca cgccgcacgc	60
	ccgcaggtgc aactgcagga aagcgggccc ggtctggtga agccctcaga aacgetctcc	120
	ctcacctgta cagtctctgg cgattcaate tcttcatatt actggacgtg gatcaggcag	180
	cctcccggca agggactgga gtggatcgga tatactact atagtggcac cactaactat	240
	aatccttccc tgaaaagccg ggtgacaatc tctgttgaca cctccaagag ccagttcagc	300
	ctgaaactct ccagtgtgac agccgccgat acagccgtgt attactgtgc ctctatcgtc	360
	gtgcgcgggt tcttttttga ttattggggc caggggacac tggtgaccgt tagcagcggg	420
	ggaggagggt ccggtggcgg cggcagcggg ggccgggggt cagaaattgt actgaccag	480
	tcccccgca cgctctctct ctccccagg gaaagggcaa cccttagctg ccgggcgagc	540
[0008]	cagagcgtga gttcctccta cctcgcgtgg tatkagcaga agcctggaca ggctccaga	600
	ctgctgattt acggggcttc tacgagagcc accggcatac ctgatagggt ctctggctcc	660
	gggtctggga ccgactttac tcttacaatc agcagacttg agcctgaaga cttegtctgtg	720
	tattattgtc aacaatacgg aacgtcccc cttacctttg gtggcgggac aaaagtggaa	780
	attaagaggg ccgctgcctt tgataatgaa aagtcaaacg gaacaatcat tcacgtgaag	840
	ggcaagcacc tctgtccgtc acccttgctc cctggtccat ccaagccatt ctgggtgttg	900
	gtcgtagtgg gtggagtctt cgcttggtac tctctgctcg tcaccgtggt ttttataatc	960
	ttctgggttc gcttttccgt cgtaagcgg gggagaaaaa agctgctgta cattttcaaa	1020
	cagccgttta tgaggccggt ccaaagcact caggaagaag acggctgctc ctgccgcttt	1080
	cctgaggagg aggaggcgg gtgcgaactg aggggtgaagt tttccagatc tgcagatgca	1140
	ccagcgtatc agcagggccca gaaccaactg tataacgagc tcaacctggg acgcagggaa	1200
	gagtatgacg ttttgacaa gcgcagagga cgggacctg agatgggtgg caaaccaaga	1260
	cgaaaaaac cccaggaggg tctctataat gagctgcaga aggataagat ggctgaagcc	1320
	tattctgaaa tagcatgaa aggagagcgg agaaggggaa aagggcacga cggtttgtac	1380
	cagggactca gcaactgtac gaaggatact tatgacgctc tccacatgca agccctgcca	1440

cctaggtaa

1449

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 482

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

&lt;400&gt; 18

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
20 25 30Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp  
35 40 45[0009] Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
50 55 60Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr  
65 70 75 80Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys  
85 90 95Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ile Ala Val Arg Gly Phe Phe Phe Asp Tyr  
115 120 125Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
130 135 140Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln  
145 150 155 160

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser

	165	170	175
	Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln 180	185	190
	Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr 195	200	205
	Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr 210	215	220
	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val 225	230	235
	Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly 245	250	255
	Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Asp Asn Glu Lys Ser 260	265	270
[0010]	Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro 275	280	285
	Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly 290	295	300
	Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile 305	310	315
	Phe Trp Val Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu 325	330	335
	Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu 340	345	350
	Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys 355	360	365
	Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln 370	375	380
	Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu		

385		390		395		400
Glu Tyr Asp Val	Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly	405		410		415
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu		420		425		430
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly		435		440		445
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser		450		455		460
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro		465		470		475
						480
Pro Arg						

[0011] <210> 19  
 <211> 1431  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 19	
atggcactcc ccgtaactgc tctgctgctg ccgttggcat tgctcctgca cgccgcacgc	60
ccgcaggtgc aactgcagga aagcgggcc ggtctggtga agccctcaga aacgctctcc	120
ctcacctgta cagtctctgg cgattcaatc tcttcatatt actggacgtg gatcaggcag	180
cctcccggca agggactgga gtggatcgga tatactact atagtggcac cactaactat	240
aatccttccc tgaaaagccg ggtgacaatc tctgttgaca cctccaagag ccagttcagc	300
ctgaaactct ccagtgtgac agccgccgat acagccgtgt attactgtgc ctctatcget	360
gtgcgcgggt tcttttttga ttattggggc caggggacac tggtgaccgt tagcagcggg	420
ggaggagggt ccggtggcgg cggcagcggg ggcgggggtt cagaaattgt actgaccag	480
tccccggca cgctctctct ctccccagg gaaagggcaa cccttagctg ccgggcgagc	540



Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr  
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys  
85 90 95

Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ile Ala Val Arg Gly Phe Phe Phe Asp Tyr  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln  
145 150 155 160

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
165 170 175

[0013]

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln  
180 185 190

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr  
195 200 205

Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
210 215 220

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val  
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly  
245 250 255

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Asp Asn Glu Lys Ser  
260 265 270

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro  
275 280 285

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly  
 290 295 300

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile  
 305 310 315 320

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met  
 325 330 335

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro  
 340 345 350

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe  
 355 360 365

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu  
 370 375 380

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp  
 385 390 395 400

[0014]

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys  
 405 410 415

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala  
 420 425 430

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys  
 435 440 445

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr  
 450 455 460

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 465 470 475

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 1458

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 21

atggcactcc ccgtaactgc tctgetgctg ccgttggcat tgctcctgca cgccgcacgc	60
ccgcaggtcc agctgggtgca gtctggggca gaggtgaaac ggccgggtgc aagcgtgaag	120
gtgtcctgca aagcctctgg ctataccttt actgggtact atatgcactg ggttcggcag	180
gcgccaggac agggctttga gtggatgggt tggattgatc caaactctgg cgatacaaat	240
tacgcacaga aattccaggg ccgcgtgacg atgactcgag acacttccat atccaccgcc	300
tatatggaag tgaatagact ccggtctgac gacactgctg tctattactg tgcaagggat	360
cccaaccggc ggagttggta ttacggaatg gatgtctggg cccagggtac taccgtcacg	420
gtgtcttctg gcggcggggg ctcaggagga ggaggcagcg gtggaggagg cagcgatatt	480
cagatgacac aaagcccttc tagtctctcc gcaagcgttg gcgaccgcgt gaccattacg	540
tgtcaggctt cacaagatat tcgaaactac ctgaaactgg atcagcagaa gcccggcaaa	600
gcacctaaag tgctgattta tgacgctagc aaccttgaga ctggcgctcc ctccagattt	660
[0015] tccggcagcg gctcaggcac cgactttact tttaccatct ccacactcca gccagaagat	720
attgcaacgt attactgcca acattatgat aacctgcctt tgaccttcgg aggtggcacc	780
aaggtagaga tcagaagagc cgctgccctt gataatgaaa agtcaaacgg aacaatcatt	840
cacgtgaagg gcaagcacct ctgtccgtca cccttgttcc ctggtccatc caagccatc	900
tgggtgttgg tcgtagtggg tggagtcctc gcttgttact ctctgctcgt caccgtgget	960
tttataatct tctgggttcg cttttccgtc gttaagcggg ggagaaaaaa gctgctgtac	1020
atthtcaaac agccgtttat gaggccggtc caaacgactc aggaagaaga cggtgctcc	1080
tgccgctttc ctgaggagga ggaggcggg tgcgaaactga gggatgaagt ttccagatct	1140
gcagatgcac cagcgtatca gcaggccag aaccaactgt ataacgagct caacctggga	1200
cgcagggaag agtatgacgt tttggacaag cgcagaggac gggaccctga gatgggtggc	1260
aaaccaagac gaaaaaaccc ccaggagggt ctctataatg agctgcagaa ggataagatg	1320
gctgaagcct attctgaaat aggcataaaa ggagagcgga gaaggggaaa agggcacgac	1380
ggtttgtacc agggactcag cactgctacg aaggatactt atgacgctct ccacatgcaa	1440
gccctgccac ctaggtaa	1458

<210> 22  
 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 22  
 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 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val  
 20 25 30

Lys Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
 35 40 45

Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln  
 50 55 60

[0016] Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn  
 65 70 75 80

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser  
 85 90 95

Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Val Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr  
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Asn Arg Arg Ser Trp Tyr Tyr  
 115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Ala Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile  
 145 150 155 160

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg  
 165 170 175

Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

	180	185	190																
	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp			
			195					200					205						
	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly			
		210					215					220							
	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp			
	225					230				235						240			
	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Asp	Asn	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe			
					245					250					255				
	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn			
				260					265					270					
	Glu	Lys	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys			
			275					280					285						
[0017]	Pro	Ser	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val			
		290					295					300							
	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala			
	305					310					315					320			
	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys			
					325					330					335				
	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr			
				340					345					350					
	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu			
			355					360					365						
	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro			
		370					375					380							
	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly			
	385					390					395					400			
	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro			

	405	410	415
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr	420	425	430
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly	435	440	445
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln	450	455	460
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln	465	470	475
Ala Leu Pro Pro Arg	485		

<210> 23  
 <211> 1440  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0018]

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 23  
 atggcactcc ccgtaactgc tctgctgctg ccgttggcat tgctcctgca cgccgcacgc 60  
 ccgcaggtcc agctggtgca gtctggggca gaggtgaaac ggccgggtgc aagcgtgaag 120  
 gtgtcctgca aagcctctgg ctataccttt actgggtact atatgactg ggttcggcag 180  
 gcgccaggac agggctcttga gtggatgggt tggattgatc caaactctgg cgatacaaat 240  
 tacgcacaga aattccaggg ccgcgtgacg atgactcgag acacttccat atccaccgcc 300  
 tatatggaag tgaatagact ccggtctgac gacactgctg tctattactg tgcaagggat 360  
 cccaaccggc ggagttggta ttacggaatg gatgtctggg ccaggggtac taccgtcacg 420  
 gtgtcttctg gcggcggggg ctcaggagga ggaggcagcg gtggaggagg cagcgatatt 480  
 cagatgacac aaagcccttc tagtctctcc gcaagcgttg gcgaccgcgt gaccattacg 540  
 tgtcaggctt cacaagatat tcgaaactac ctgaactggt atcagcagaa gcccgcaaaa 600  
 gcacctaage tgctgattta tgacgctagc aaccttgaga ctggcgtccc ctccagattt 660

```

tccggcagcg gctcaggcac cgactttact ttaccatct ccacactcca gccagaagat      720
attgcaacgt attactgcca acattatgat aacctgcctt tgaccttcgg aggtggcacc      780
aaggtagaga tcagaagagc cgctgccctt gataatgaaa agtcaaacgg aacaatcatt      840
cacgtgaagg gcaagcacct ctgtccgtea cccttgttcc ctggtccatc caagccattc      900
tgggtgttgg tcgtagtggg tggagtcctc gcttgttact ctctgctcgt cacctgggct      960
tttataatct tctgggtag atccaaaaga agccgcctgc tccatagcga ttacatgaat     1020
atgactccac gccgccctgg cccacaaggg aaacactacc agccttacgc accacctaga     1080
gatttcgctg cctatcggag ccgagtgaaa ttttctagat cagctgatgc tccgcctat     1140
cagcagggac agaatcaact ttacaatgag ctgaacctgg gtcgcagaga agagtacgac     1200
gttttgaca aacgccgggg ccgagatcct gagatggggg ggaagccgag aaggaagaat     1260
cctcaagaag gcctgtacaa cgagcttcaa aaagacaaaa tggctgaggc gtactctgag     1320
atcggcatga agggcgagcg gagacgaggc aagggtcacg atggcttgta tcaggcctg     1380
agtacagcca caaaggacac ctatgacgcc ctccacatgc aggcaactgcc cccacgetag     1440

```

[0019]

```

<210> 24
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的
      多肽"

```

```

<400> 24
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 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
20           25           30

Lys Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35           40           45

Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
50           55           60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn
65           70           75           80

```

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser  
85 90 95

Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Val Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr  
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Asn Arg Arg Ser Trp Tyr Tyr  
115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Ala Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile  
145 150 155 160

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg  
165 170 175

Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn  
180 185 190

[0020]

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp  
195 200 205

Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
210 215 220

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Leu Gln Pro Glu Asp  
225 230 235 240

Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe  
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg Ala Ala Ala Leu Asp Asn  
260 265 270

Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys  
275 280 285

Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val  
290 295 300

Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala  
305 310 315 320

Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser  
325 330 335

Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His  
340 345 350

Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg  
355 360 365

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
370 375 380

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp  
385 390 395 400

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro  
405 410 415

[0021]

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp  
420 425 430

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
435 440 445

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
450 455 460

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
465 470 475

<210> 25

<211> 1437

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 25		
atggcactcc ccgtaactgc tctgctgctg ccgttggcat tgctcctgca cgccgcacgc		60
ccgcaagtgc agttgggtgca gtctggagct gaagtgaaga aaccaggcgc tagcgtcaaaa		120
gtgagctgta aggcctcagg ttacacgttt actgggtact atatgcattg ggtcaggcaa		180
gcccctggcc agggcctcga gtggatgggc tggattaatc ctaacagcgg ggacacaagc		240
tatgcccac gcttcctggg cagagtaaca atgacacggg atacaagtat taacaccgtc		300
catatggaac tctctcggtt cggtcagat gataccgcgg tttattactg tgctagggag		360
gacgactcct cttggatgg cagcttcgat tattgggggc agggaaccct ggtgacagtc		420
tcatctgggt gagggggctc cgggggtggg ggcagcggag ggggaggttc tgatatacag		480
atgactcaga gtccctcaag cttgagtgcc agtgtaggcg accgggtgac gataacctgt		540
agggcttcac agggaatcag aaattatctg ggttggtacc agcagaagcc aggaaaggca		600
cctaaaagac ttatttacgc cgcctcctcc ttgcagtccg gcgtgccatc aaaattttct		660
gggagcggct ctggaaccga gttaccctc acgatctcca gcctccagcc cgaggacttt		720
gccacctact attgcctgca gcacgatagt gatctgcgaa cttttgggca aggcactaaa		780
[0022] gtggaatta agagagccgc tgccttgat aatgaaaagt caaacggaac aatcattcac		840
gtgaagggca agcacctctg tccgtcacc ttttccctg gtccatcaa gccattctgg		900
gtgttggtcg tagtgggtgg agtctctgct ttttactctc tgctcgtcac cgtggctttt		960
ataatcttct gggttagatc caaaagaagc cgcctgctcc atagcgatta catgaatag		1020
actccagcc gcctggccc cacaaggaaa cactaccage cttacgcacc acctagagat		1080
ttcgtgctt atcggagccg agtgaaattt tctagatcag ctgatgctcc cgcctatcag		1140
caggacaga atcaacttta caatgagctg aacctgggtc gcagagaaga gtacgacgtt		1200
ttggacaaac gccggggccg agatcctgag atggggggga agccgagaag gaagaatcct		1260
caagaaggcc tgtacaacga gttcaaaaa gacaaaatgg ctgaggcgta ctctgagatc		1320
ggcatgaagg gcgagcggag acgaggcaag ggtcacgatg gcttgatca gggcctgagt		1380
acagccacaa aggacaccta tgacgcctc cacatgcagg cactgcccc acgctag		1437
<210> 26		
<211> 478		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 26

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 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val  
20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
35 40 45

Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser  
65 70 75 80

Tyr Ala Gln Arg Phe Leu Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser  
85 90 95

[0023]

Ile Asn Thr Val His Met Glu Leu Ser Arg Leu Gly Ser Asp Asp Thr  
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Asp Ser Ser Trp Tyr Gly Ser  
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln  
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val  
165 170 175

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Gly Trp  
180 185 190

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala  
195 200 205

Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
210 215 220

Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
225 230 235 240

Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Ser Asp Leu Arg Thr Phe Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Asp Asn Glu  
260 265 270

Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro  
275 280 285

Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val  
290 295 300

Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe  
305 310 315 320

[0024]

Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp  
325 330 335

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr  
340 345 350

Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val  
355 360 365

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn  
370 375 380

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val  
385 390 395 400

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg  
405 410 415

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys  
420 425 430

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg  
 435 440 445

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys  
 450 455 460

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 465 470 475

<210> 27  
 <211> 1455  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

[0025]

<400> 27  
 atggcactcc ccgtaactgc tctgctgctg ccgttggcat tgctcctgca cgccgcacgc 60  
 ccgcaagtgc agttggtgca gtctggagct gaagtgaaga aaccaggcgc tagcgtcaaa 120  
 gtgagctgta aggcctcagg ttacacgttt actgggtact atatgcattg ggtcaggcaa 180  
 gcccttgcc agggcctcga gtggatgggc tggattaatc ctaacagcgg ggacacaagc 240  
 tatgccaac gcttctggg cagagtaaca atgacacggg atacaagtat taacaccgtc 300  
 catatggaac tctctcggt cggtcagat gataccgagg tttattactg tgctagggag 360  
 gacgactcct cttggtatgg cagcttcgat tattgggggc agggaaccct ggtgacagtc 420  
 tcatctggtg gaggggctc cgggggtggg ggcagcggag ggggaggttc tgatatacag 480  
 atgactcaga gtccctcaag cttgagtgcc agtgtaggcg accgggtgac gataacctgt 540  
 agggcttcac agggaatcag aaattatctg ggttggtacc agcagaagcc aggaaaggca 600  
 cctaaaagac ttatttacgc cgcacctcc ttgcagtccg gcgtgccatc aaaattttct 660  
 gggagcggct ctggaaccga gttaccctc acgatctcca gcctccagcc cgaggacttt 720  
 gccacctact attgcctgca gcacgatagt gatctgcgaa cttttgggca aggcactaaa 780  
 gtggaatta agagagccgc tgccttgat aatgaaaagt caaacggaac aatcattcac 840  
 gtgaagggea agcacctctg tccgtcacc ttgttcctg gtccatcaa gccattctgg 900  
 gtgttggtcg tagtgggtgg agtcctcgt tgttactctc tgctcgtcac cgtgctttt 960

ataatcttct gggttcgctt ttccgtcggt aagcggggga gaaaaagct gctgtacatt 1020  
 ttcaaacagc cgtttatgag gccggtccaa acgactcagg aagaagacgg ctgctcctgc 1080  
 cgcttttctg aggaggagga gggcgggtgc gaactgaggg tgaagttttc cagatctgca 1140  
 gatgcaccag cgtatcagca gggccagaac caactgtata acgagctcaa cctgggacgc 1200  
 agggaagagt atgacgtttt ggacaagcgc agaggacggg accctgagat ggggtggcaaa 1260  
 ccaagacgaa aaaacccccca ggagggtctc tataatgagc tgcagaagga taagatggct 1320  
 gaagcctatt ctgaaatagg catgaaagga gagcggagaa ggggaaaagg gcacgacggt 1380  
 ttgtaccagg gactcagcac tgctacgaag gatacttatg acgctctcca catgcaagcc 1440  
 ctgccaccta ggtaa 1455

<210> 28

<211> 484

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

[0026]

<400> 28

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 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val  
 20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
 35 40 45

Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln  
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser  
 65 70 75 80

Tyr Ala Gln Arg Phe Leu Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser  
 85 90 95

Ile Asn Thr Val His Met Glu Leu Ser Arg Leu Gly Ser Asp Asp Thr  
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Asp Ser Ser Trp Tyr Gly Ser  
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln  
145 150 155 160

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val  
165 170 175

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Gly Trp  
180 185 190

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala  
195 200 205

Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
210 215 220

[0027]

Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe  
225 230 235 240

Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Ser Asp Leu Arg Thr Phe Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Asp Asn Glu  
260 265 270

Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro  
275 280 285

Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val  
290 295 300

Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe  
305 310 315 320

Ile Ile Phe Trp Val Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys  
325 330 335

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr  
 340 345 350

Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly  
 355 360 365

Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala  
 370 375 380

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg  
 385 390 395 400

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu  
 405 410 415

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
 420 425 430

[0028] Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
 435 440 445

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
 450 455 460

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
 465 470 475 480

Leu Pro Pro Arg

<210> 29

<211> 618

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Met Val Ser Pro Arg Met Ser Gly Leu Leu Ser Gln Thr Val Ile Leu  
 1 5 10 15

Ala Leu Ile Phe Leu Pro Gln Thr Arg Pro Ala Gly Val Phe Glu Leu  
 20 25 30

Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro Arg Ser  
 35 40 45

Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu Phe Phe Arg Val Cys Leu  
 50 55 60

Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys Ala Leu Gly  
 65 70 75 80

Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr Thr Glu Gln Pro Gly Ala  
 85 90 95

Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly Leu Leu Gln Val Pro Phe  
 100 105 110

Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe Ile Ile Glu Thr Trp Arg  
 115 120 125

Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro Ala Trp Ser Leu Leu Ala  
 130 135 140

[0029]

Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Arg  
 145 150 155 160

Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg Phe Ser Tyr Arg Ala  
 165 170 175

Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg Leu Cys Arg  
 180 185 190

Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Cys Ala  
 195 200 205

Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu Val Cys Arg Ala Gly Cys  
 210 215 220

Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys Arg Cys Leu  
 225 230 235 240

Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val Pro Val Ser Thr Ser Ser  
 245 250 255

Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala Thr Thr Gly Cys Leu Val  
 260 265 270

Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Ser  
 275 280 285

Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg Gly Phe  
 290 295 300

Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Cys Ala Asp Gly Pro  
 305 310 315 320

Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ala  
 325 330 335

Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Asn Cys Glu Lys  
 340 345 350

Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Leu Cys  
 355 360 365

[0030]

Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg Cys Arg Ala Gly Phe Ala  
 370 375 380

Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp Cys Ala Gly Arg Ala Cys  
 385 390 395 400

Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly Gly Ala His Arg Cys Ser  
 405 410 415

Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys Arg Glu Arg Ala Asp Pro  
 420 425 430

Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly Arg Cys Tyr Ala His Phe  
 435 440 445

Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Met Gly Ala Arg Cys  
 450 455 460

Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser Ala Leu Pro Ala Ala Pro  
 465 470 475 480

Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Leu Pro Pro Ala  
485 490 495

Leu Gly Leu Leu Val Ala Ala Gly Val Ala Gly Ala Ala Leu Leu Leu  
500 505 510

Val His Val Arg Arg Arg Gly His Ser Gln Asp Ala Gly Ser Arg Leu  
515 520 525

Leu Ala Gly Thr Pro Glu Pro Ser Val His Ala Leu Pro Asp Ala Leu  
530 535 540

Asn Asn Leu Arg Thr Gln Glu Gly Ser Gly Asp Gly Pro Ser Ser Ser  
545 550 555 560

Val Asp Trp Asn Arg Pro Glu Asp Val Asp Pro Gln Gly Ile Tyr Val  
565 570 575

Ile Ser Ala Pro Ser Ile Tyr Ala Arg Glu Val Ala Thr Pro Leu Phe  
580 585 590

[0031]

Pro Pro Leu His Thr Gly Arg Ala Gly Gln Arg Gln His Leu Leu Phe  
595 600 605

Pro Tyr Pro Ser Ser Ile Leu Ser Val Lys  
610 615

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 587

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 30

Met Val Ser Pro Arg Met Ser Gly Leu Leu Ser Gln Thr Val Ile Leu  
1 5 10 15

Ala Leu Ile Phe Leu Pro Gln Thr Arg Pro Ala Gly Val Phe Glu Leu  
20 25 30

Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro Arg Ser  
35 40 45

Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu Phe Phe Arg Val Cys Leu  
50 55 60

Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys Ala Leu Gly  
65 70 75 80

Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr Thr Glu Gln Pro Gly Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly Leu Leu Gln Val Pro Phe  
100 105 110

Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe Ile Ile Glu Thr Trp Arg  
115 120 125

Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro Ala Trp Ser Leu Leu Ala  
130 135 140

Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Arg  
145 150 155 160

Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg Phe Ser Tyr Arg Ala  
165 170 175

[0032]

Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg Leu Cys Arg  
180 185 190

Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Cys Ala  
195 200 205

Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu Val Cys Arg Ala Gly Cys  
210 215 220

Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys Arg Cys Leu  
225 230 235 240

Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val Pro Val Ser Thr Ser Ser  
245 250 255

Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala Thr Thr Gly Cys Leu Val  
260 265 270

Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Ser  
275 280 285

Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg Gly Phe  
290 295 300

Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Cys Ala Asp Gly Pro  
305 310 315 320

Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ala  
325 330 335

Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Asn Cys Glu Lys  
340 345 350

Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Leu Cys  
355 360 365

Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg Cys Arg Ala Gly Phe Ala  
370 375 380

Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp Cys Ala Gly Arg Ala Cys  
385 390 395 400

[0033]

Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly Gly Ala His Arg Cys Ser  
405 410 415

Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys Arg Glu Arg Ala Asp Pro  
420 425 430

Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly Arg Cys Tyr Ala His Phe  
435 440 445

Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Met Gly Ala Arg Cys  
450 455 460

Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser Ala Leu Pro Ala Ala Pro  
465 470 475 480

Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Leu Pro Pro Ala  
485 490 495

Leu Gly Leu Leu Val Ala Ala Gly Val Ala Gly Ala Ala Leu Leu Leu  
500 505 510

Val His Val Arg Arg Arg Gly His Ser Gln Asp Ala Gly Ser Arg Leu  
 515 520 525

Leu Ala Gly Thr Pro Glu Pro Ser Val His Ala Leu Pro Asp Ala Leu  
 530 535 540

Asn Asn Leu Arg Thr Gln Glu Gly Ser Gly Asp Gly Pro Ser Ser Ser  
 545 550 555 560

Val Asp Trp Asn Arg Pro Glu Asp Val Asp Pro Gln Gly Ile Tyr Val  
 565 570 575

Ile Ser Ala Pro Ser Ile Tyr Ala Arg Glu Ala  
 580 585

<210> 31  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0034] <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 31  
 atggcactcc ccgtaactgc tctgctgctg ccgttggcat tgetcctgca cgccgcacgc 60  
 ccg 63

<210> 32  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 32  
 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> 33  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 33  
 ggcggtggag gctccggagg ggggggctct ggcggagggg gctcc

45

<210> 34  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 34  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

[0035]

<210> 35  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"

<400> 35  
 gggctctacat ccggtccgg gaagcccgga agtggcgaag gtagtacaaa gggg

54

<210> 36  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 36  
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 37  
 <211> 126  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 37  
 aagcggggga gaaaaagct gctgtacatt ttcaaacagc cgtttatgag gccggtccaa 60  
 acgactcagg aagaagacgg ctgctcctgc cgctttcctg aggaggagga gggcgggtgc 120  
 gaactg 126

[0036]

<210> 38  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 38  
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 1 5 10 15  
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
 20 25 30  
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 35 40

<210> 39  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的"

多肽”

<400> 39

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser  
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile  
35

<210> 40

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 40

[0037]

caggtgcaac tgcaggaaag cgggcccggt ctggtgaage cctcagaaac gctetccctc 60  
acctgtacag tctctggcga ttcaatctct tcatattact ggacgtggat caggcagcct 120  
cccggcaagg gactggagtg gatcggatat atctactata gtggcaccac taactataat 180  
ccttccctga aaagccgggt gacaatctct gttgacacct ccaagagcca gttcagcctg 240  
aaactctcca gtgtgacagc cgccgataca gccgtgtatt actgtgcctc tatcgctgtg 300  
cgcggttct tttttgatta ttggggccag gggacactgg tgaccgttag cagc 354

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 41

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Ser Ile Ala Val Arg Gly Phe Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

[0038]

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的肽"

&lt;400&gt; 42

Ser Tyr Tyr Trp Thr  
 1 5

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的肽"

&lt;400&gt; 43

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 44  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 44  
 Ile Ala Val Arg Gly Phe Phe Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 45  
 <211> 327  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

[0039] <400> 45  
 gaaattgtac tgaccagtc ccccgacag ctctctctct cccagggga aaggcaacc 60  
 cttagctgcc gggcgagcca gacgtgagt tcctcctacc tcgctggta tcagcagaag 120  
 cctggacagg ctcccagact gctgatttac ggggcttcta cgagagccac cggcatacct 180  
 gatagttct ctggtccgg gtctgggacc gactttactc ttacaatcag cagacttgag 240  
 cctgaagact tcgctgtgta ttattgtcaa caatcggaa cgtccccct taccttggt 300  
 ggcgggacaa aagtggaaat taagagg 327

<210> 46  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 46  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro  
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

[0040]

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 47

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 48

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr  
 1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 49  
 Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 50  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

[0041]

<400> 50  
 caggtccagc tgggtcagtc tggggcagag gtgaaacggc cgggtgcaag cgtgaaggtg 60  
 tcctgcaaag cctctggcta tacctttact gggactata tgcactgggt tcggcaggcg 120  
 ccaggacagg gtcttgagtg gatgggttg attgatcaa actctggcga taaaattac 180  
 gcacagaaat tccagggccg cgtgacgatg actcgagaca ctccatata caccgcctat 240  
 atggaagtga atagactccg gtctgacgac actgctgtct attactgtgc aaggatccc 300  
 aaccggcgga gttgtatta cggaatgat gtctgggccc aggtactac cgtcacgggtg 360  
 tcttct 366

<210> 51  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 51  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Val Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asp Pro Asn Arg Arg Ser Trp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 100 105 110

Ala Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0042] <210> 52  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"  
 <400> 52  
 Gly Tyr Tyr Met His  
 1 5

<210> 53  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 53  
 Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

<210> 54  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 54  
 Asp Pro Asn Arg Arg Ser Trp Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 735  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

[0043] <400> 55  
 caggtccagc tgggtcagtc tggggcagag gtgaaacggc cgggtgcaag cgtgaagggt 60  
 tcctgcaaag cctctggcta tacctttact gggtactata tgcactgggt tcggcaggcg 120  
 ccaggacagg gtcttgagtg gatgggttg attgatcaa actctggcga tacaattac 180  
 gcacagaaat tccagggccg cgtgacgatg actcgagaca cttccatata caccgcctat 240  
 atggaagtga atagactccg gtctgacgac actgctgtct attactgtgc aaggatccc 300  
 aaccggcgga gttggtatta cggaatgat gtctgggccc aggtactac cgtcacggtg 360  
 tcttctggcg gcgggggctc aggaggagga ggcagcgggtg gaggaggcag cgatattcag 420  
 atgacacaaa gcccttctag tctctccgca agcgttggcg accgcgtgac cattacgtgt 480  
 caggcttcac aagatattcg aaactacctg aactggtatc agcagaagcc cggcaaagca 540  
 cctaagctgc tgatttatga cgctagcaac cttgagactg gcgtcccctc cagattttcc 600  
 ggcagcggct caggcaccga ctttactttt accatctcca cactccagcc agaagatatt 660  
 gcaacgtatt actccaaca ttatgataac ctgcctttga ccttcggagg tggaccaag 720  
 gtagagatca gaaga 735

<210> 56

<211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 56  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

[0044]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Leu Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg  
 100 105

<210> 57  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 57  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10

<210> 58  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"  
 <400> 58  
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5

<210> 59  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"  
 <400> 59  
 Gln His Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe  
 1 5 10

[0045]

<210> 60  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 60  
 caagtgcagt tggcgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac caggcgctag cgtaaagtg 60  
 agctgtaagg cctcaggtta cacgtttact gggtactata tgcattgggt caggcaagcc 120  
 cctggccagg gcctcgagtg gatgggctgg attaatccta acagcgggga cacaagctat 180  
 gcccaacgct tcctgggcag agtaacaatg acacgggata caagtattaa cacctccat 240  
 atggaactct ctcggctcgg ctcagatgat accgcggttt attactgtgc tagggaggac 300  
 gactcctctt ggatggcag cttecgattat tgggggcagg gaaccctggt gacagtctca 360  
 tct 363

<210> 61  
 <211> 121  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 61

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Arg Phe  
50 55 60

Leu Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val His  
65 70 75 80

[0046]

Met Glu Leu Ser Arg Leu Gly Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Asp Ser Ser Trp Tyr Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 62

Gly Tyr Tyr Met His  
1 5

<210> 63



<210> 66  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 66  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly  
 50 55 60

[0048] Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Ser Asp Leu Arg  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 67  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 67  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Gly  
 1 5 10

<210> 68

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 68  
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5

<210> 69  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 69  
 Leu Gln His Asp Ser Asp Leu Arg Thr Phe  
 1 5 10

[0049]

<210> 70  
 <211> 6762  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 70  
 ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga 60  
 ccgctacact tgccagcgcc ctagcggccg ctcctttcgc tttcttcctt tcctttctcg 120  
 ccacgttcgc cggctttccc cgtaagctc taaatcgggg gctcccctta gggttccgat 180  
 ttagtgcttt acggcacctc gacccccaaa aacttgatta gggatgatgg tcaacgtatg 240  
 ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt ggagtccacg ttctttaata 300  
 gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt 360  
 tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat 420  
 ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttg ccattcgcca ttcaggetgc 480

	gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag	540
	ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt	600
	gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtaatacg actcactata gggcgacccg gggatggcgc	660
	gccagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat	720
	aacttacggt aatggcccc cctggctgac cgcccaacga cccccgcca ttgacgtcaa	780
	taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg	840
	agtattttac gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc	900
	cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc cgcctggca ttatgccag tacatgacct	960
	tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgctga	1020
	tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttcaa	1080
	gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc	1140
	caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg	1200
	aggtctatat aagcagagct ggtttagtga accggggtct ctctggttag accagatctg	1260
[0050]	agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgc	1320
	ttgagtgctt caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct	1380
	cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttghaa	1440
	gcgaaagga aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg	1500
	gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgcaaaaaa ttttgactag cggaggctag	1560
	aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg	1620
	gaaaaaatc ggtaaggcc agggggaaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg	1680
	gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaac atcagaaggc	1740
	tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga	1800
	tcattatata atacagtagc aacctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac	1860
	accaaggaag cttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag	1920
	caagccgccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt ggagaagtga	1980
	attatataaa tataaagtag taaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa	2040
	gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt	2100
	cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag	2160

	acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca	2220
	acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc	2280
	tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact	2340
	catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat	2400
	ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat	2460
	acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga	2520
	attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat	2580
	aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt ttgctgtact	2640
	ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga cccacctccc	2700
	aaccccgagg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaagggtggag agagagacag	2760
	agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggat cggttaactt ttaaaagaaa	2820
	aggggggatt ggggggtaca gtgcaggga aagaatagta gacataatag caacagacat	2880
	acaaactaaa gaattacaaa acaaattac aaaattcaaa attttatcgc gatcgcggaa	2940
[0051]	tgaaagacc cacctgtagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat	3000
	ggaaaataca taactgagaa tagagaagtt cagatcaagg ttaggaacag agagacagca	3060
	gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct gccccggctc agggccaaga	3120
	acagatggtc cccagatgag gtcccgcct cagcagttc tagagaacca tcagatgttt	3180
	ccagggtgcc ccaaggacct gaaaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt	3240
	cgcttctcgc ttctgttcgc gcgttctgc tccccgagct caataaaaga gccacaacc	3300
	cctcactcgg cgcgccagtc cttegaagta gatctttgtc gatcctacca tccactcgac	3360
	acaccgcca gcggccgctg ccaagcttc gagctctcga attaattcac ggtaccacc	3420
	atggcctagg gagactagtc gaatcgatat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga	3480
	ttgactggta ttcttaacta tgttgcctt tttacgctat gtggatacgc tgetttaatg	3540
	cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt tctcctcett gtataaatcc	3600
	tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg cccgttgca ggcaacgtgg cgtggtgtgc	3660
	actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcett	3720
	tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcctcgc cgctgcctt	3780
	gcccgtgct ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca attccgtggt gttgtcggg	3840

	aagctgacgt ccttttcatg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg	3900
	tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccageggacc ttccttcccg cggcctgctg	3960
	ccggtctgce ggccctcttc gegtcttcgc cttegcctc agacgagteg gatctccctt	4020
	tgggccgctt ccccgctgg ttaattaaag tacctttaag accaatgact tacaaggcag	4080
	ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact ggaaggcgga attcactccc	4140
	aacgaagaca agatctgctt tttgettga ctgggtctct ctggtagac cagatctgag	4200
	cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt	4260
	gagtgcctca agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggtactag agatccctca	4320
	gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcaggcatgc cagacatgat aagatacatt	4380
	gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt	4440
	tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac	4500
	aattgcattc attttatggt tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttggcgcgcc	4560
	atcgtcgagg ttccctttag tgagggttaa ttgcgagctt ggcgtaatca tggatcatagc	4620
[0052]	tgtttctctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca	4680
	taaagtgtaa agcctgggggt gcctaatgag tgagctaact cacattaatt gcgttgctct	4740
	cactgcccgc tttccagtgc ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac	4800
	gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctcctc actgactcgc	4860
	tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc	4920
	tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	4980
	ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg	5040
	agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	5100
	accagcggtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccctta	5160
	ccgataacct gtccgccttt ctccctcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	5220
	gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	5280
	ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa	5340
	gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	5400
	taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggc ggcttaacta cggctacact agaagaacag	5460
	tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	5520

	gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggTTTTTT tgTTTgcaag caggagatta	5580
	cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc cTTTgatctt ttctacgggg tctgacgctc	5640
	agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggTcatgag attatcaaaa aggatcttca	5700
	cctagatcct tTtaaattaa aatgaagtt tTaaatcaat cTaaagtata tatgagtaaa	5760
	ctTggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	5820
	tTcgttcate catagttgcc tgactccccg tegtgtagat aactacgata cgggagggct	5880
	taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacce acgctcaccg gctccagatt	5940
	tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggTcct gcaactttat	6000
	ccgcctccat ccagTctatt aattgtTgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta	6060
	atagTTTgcg caacgtTgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg	6120
[0053]	gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	6180
	tgtgcaaaaa agcggTtagc tccttcggTc ctccgatcgt tgtcagaagt aagtTggccg	6240
	cagTgttate actcatggtt atggcagcac tgcataatte tcttactgtc atgccatccg	6300
	taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	6360
	ggcgaccgag ttgctctTgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa	6420
	ctTtaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac	6480
	cgctgtTgag atccagTtcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt	6540
	ttactttcac cagcgtTtct gggTgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg	6600
	gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cTTTTTcaa tattattgaa	6660
	gcatttatca gggTtattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	6720
	aacaaatagg ggttccgcgc acatttccc gaaaagtgcc ac	6762

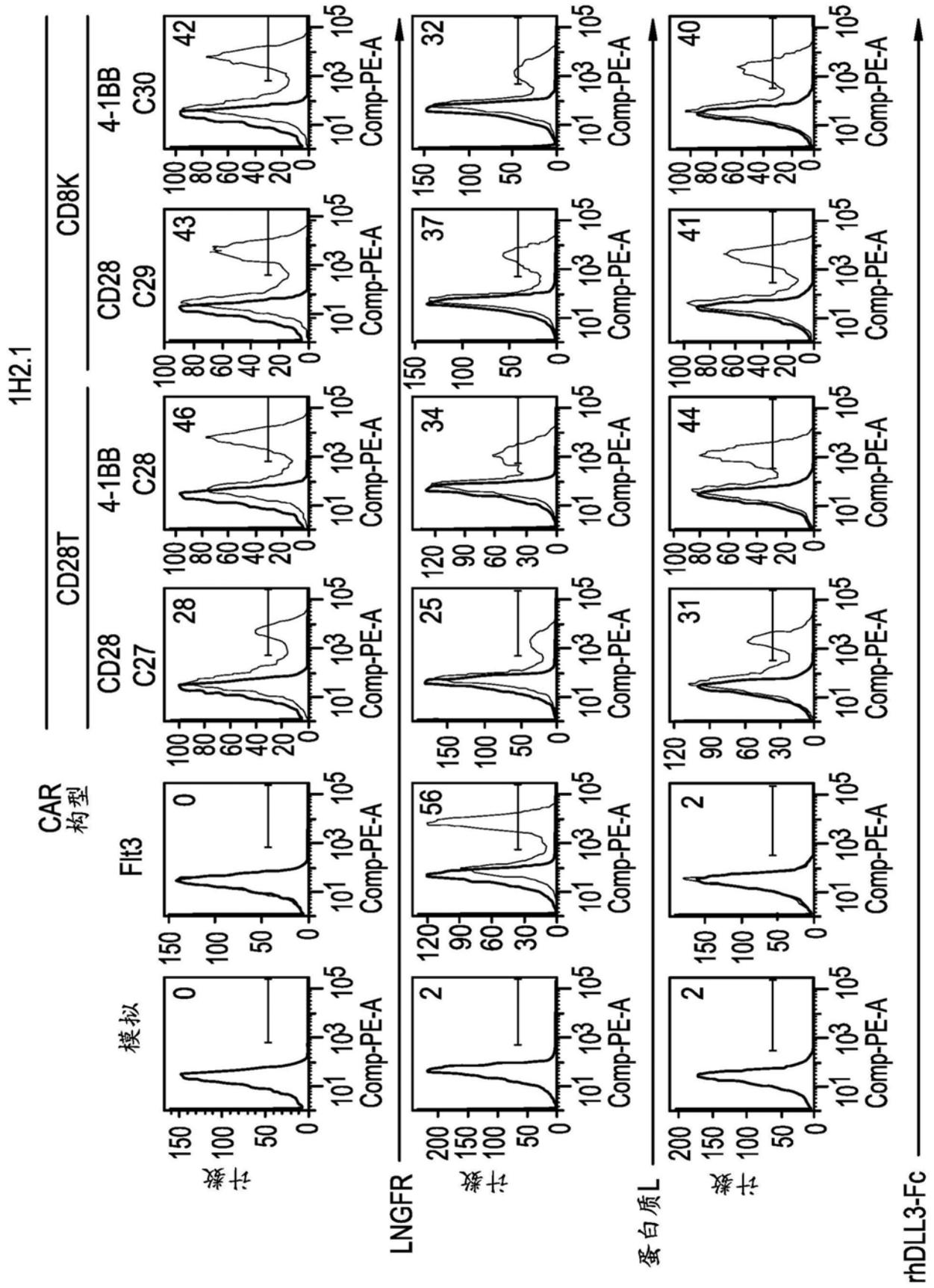


图1A

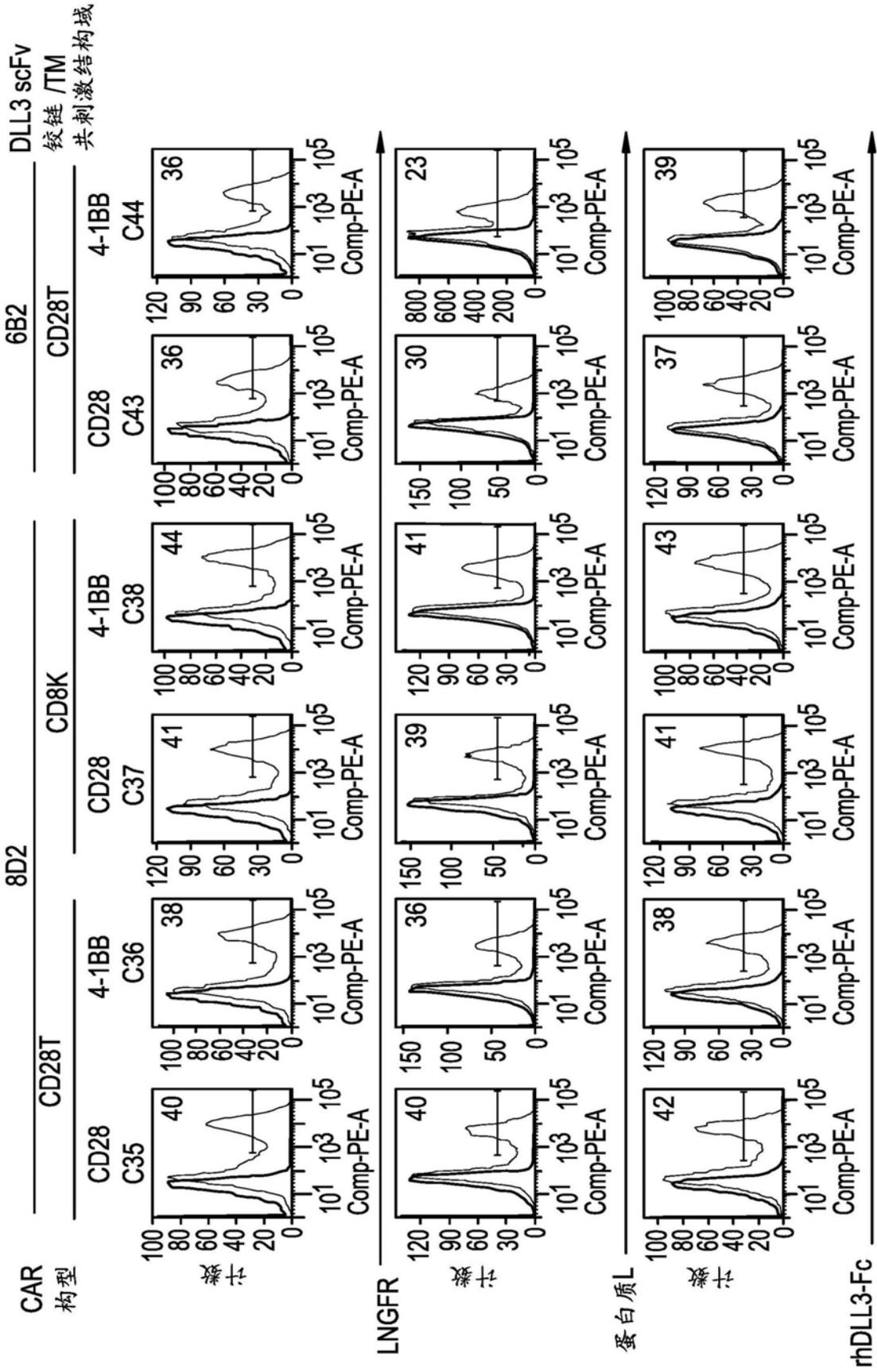


图1B

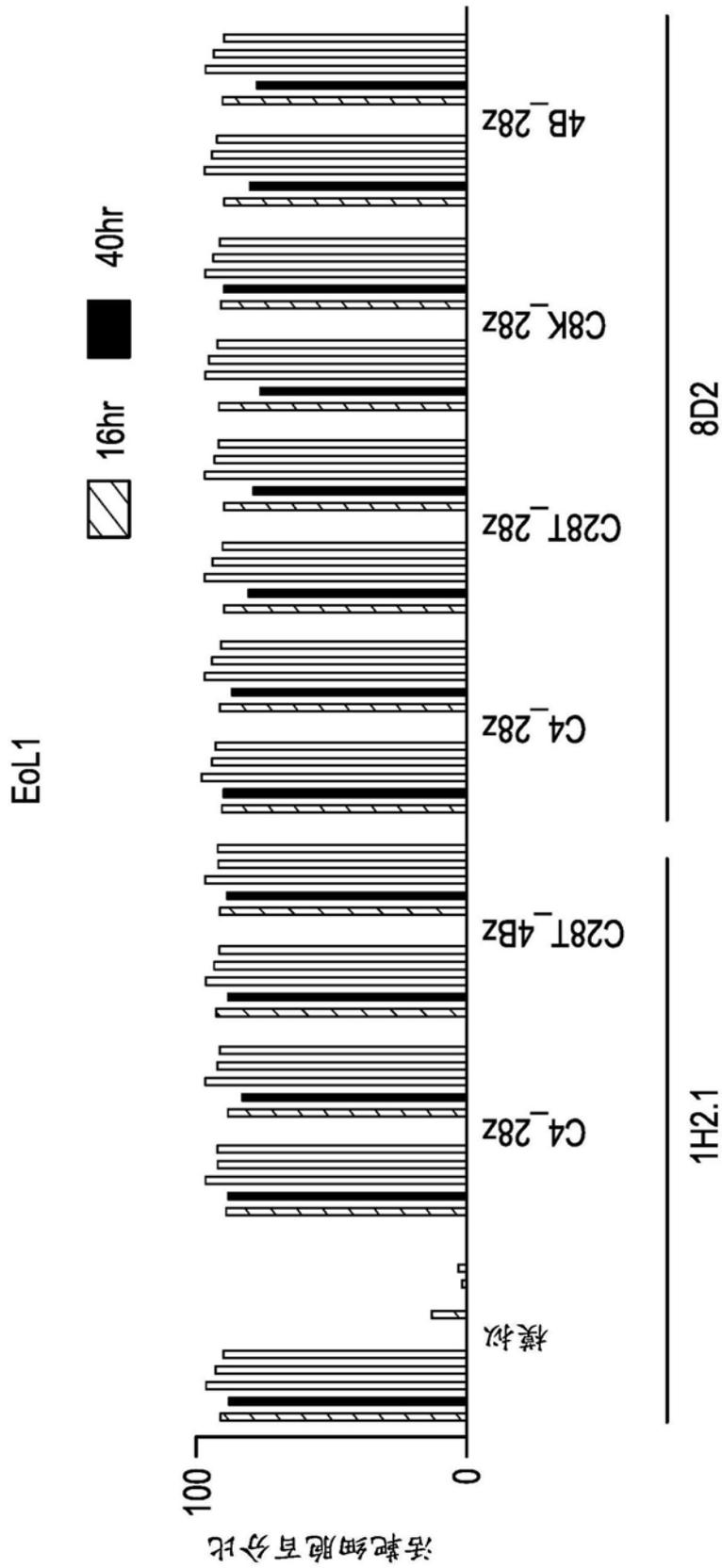


图2A

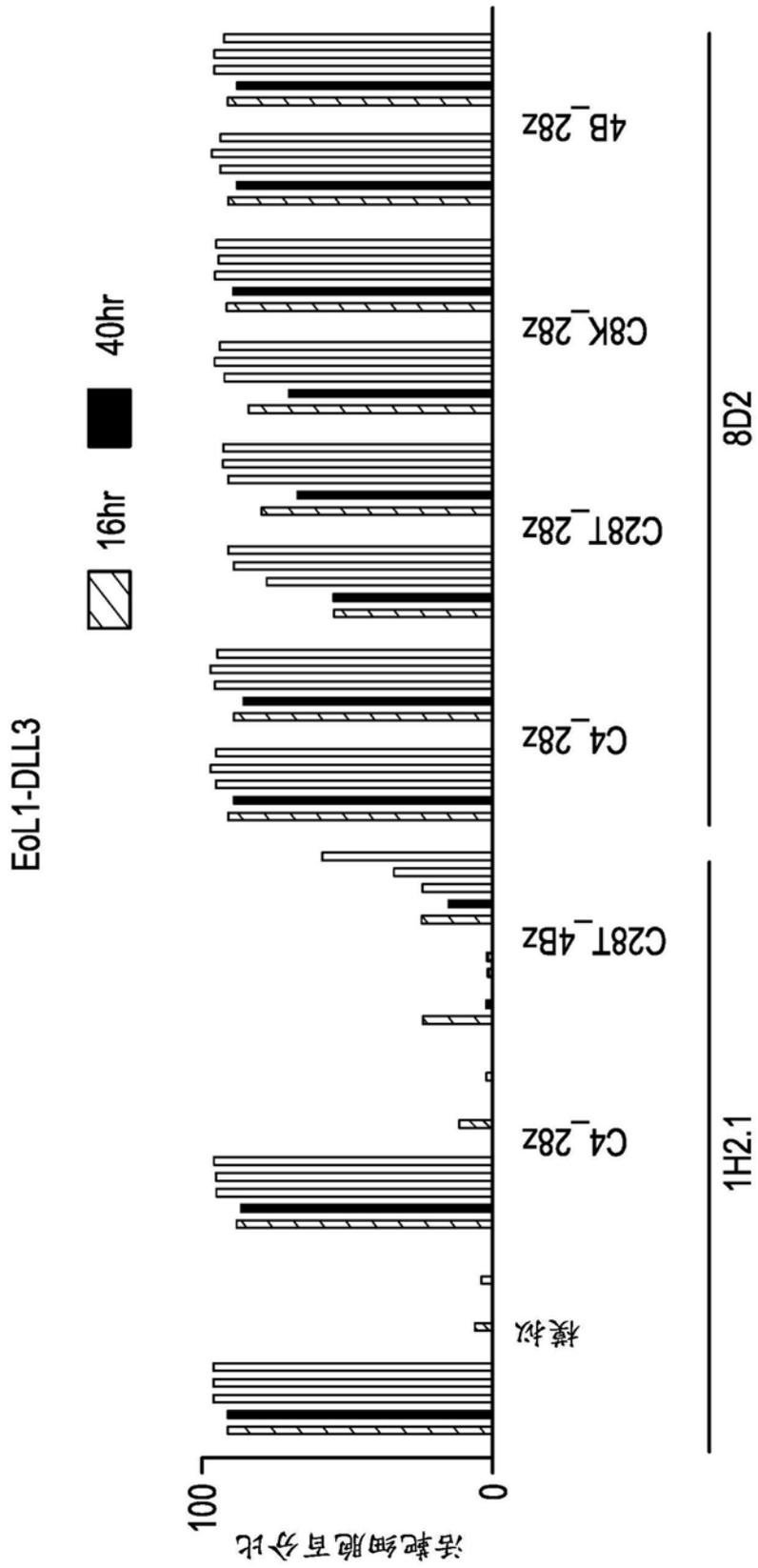


图2B

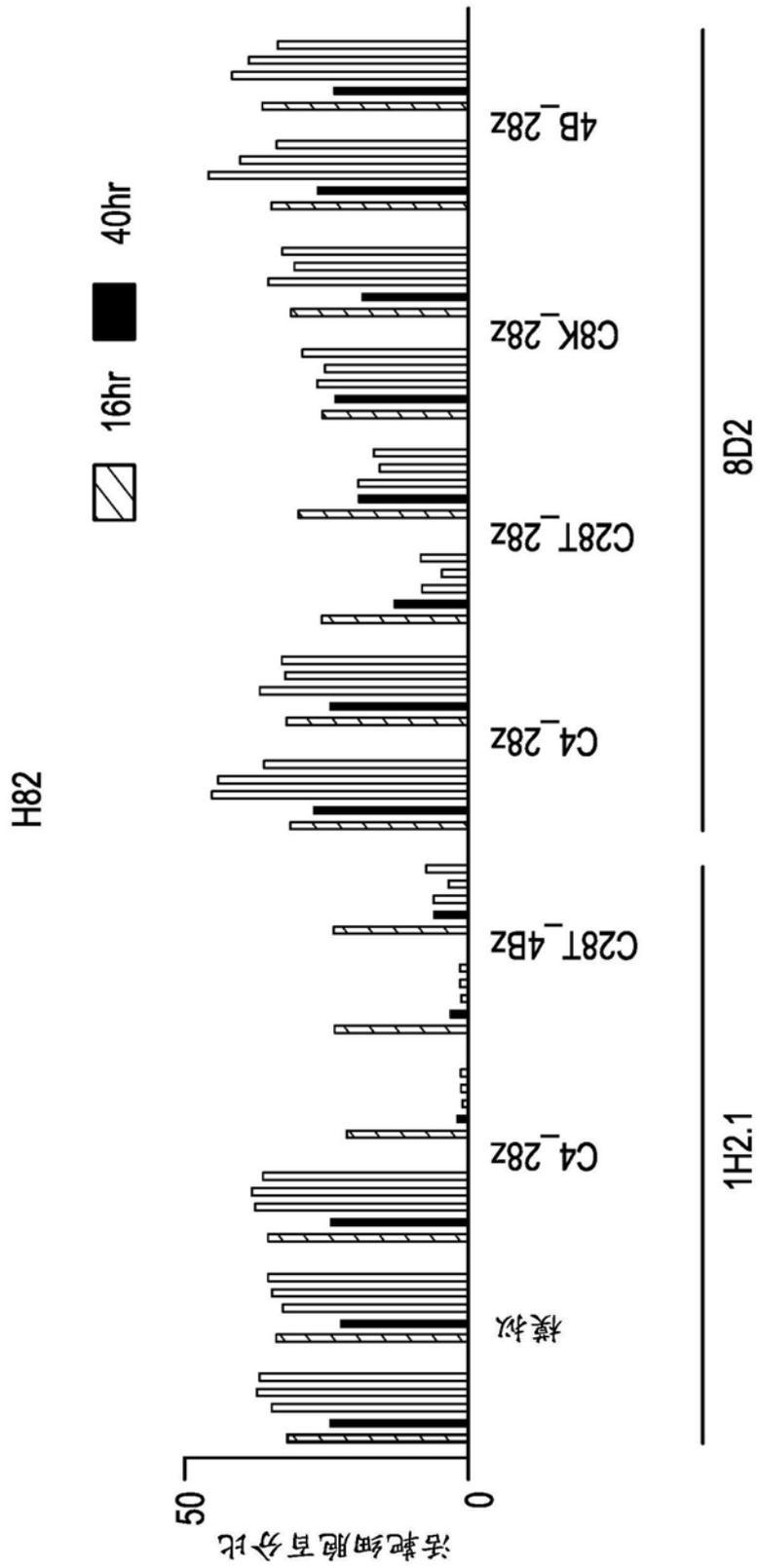


图2C

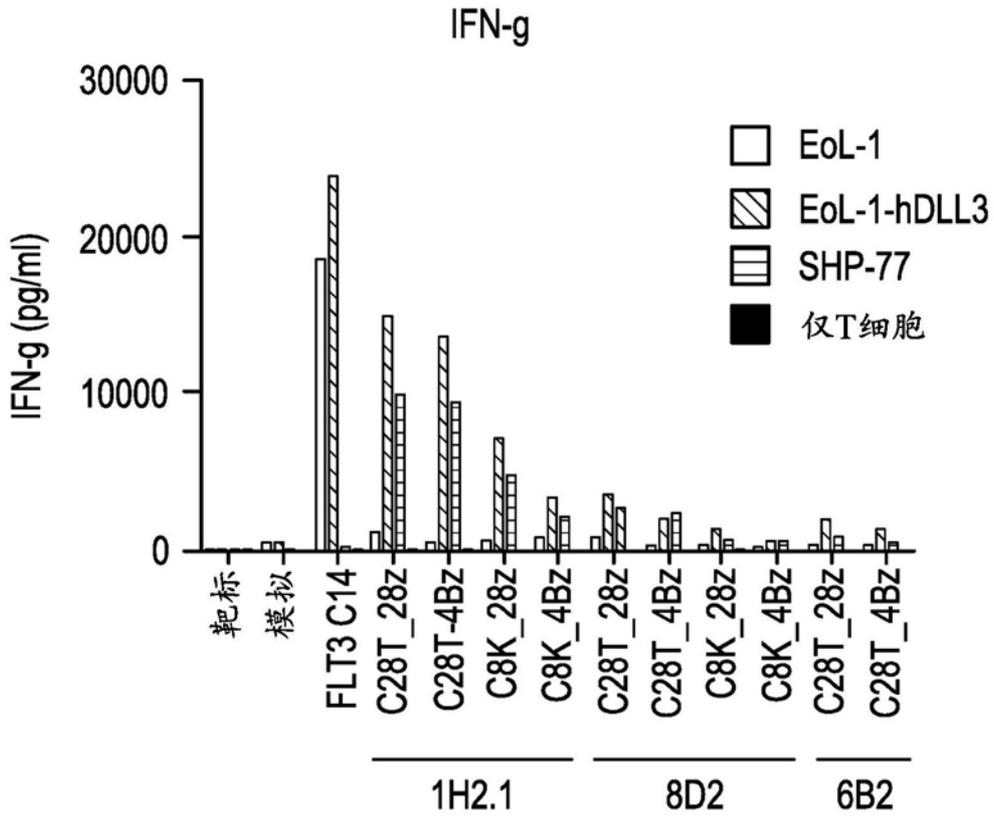


图3A

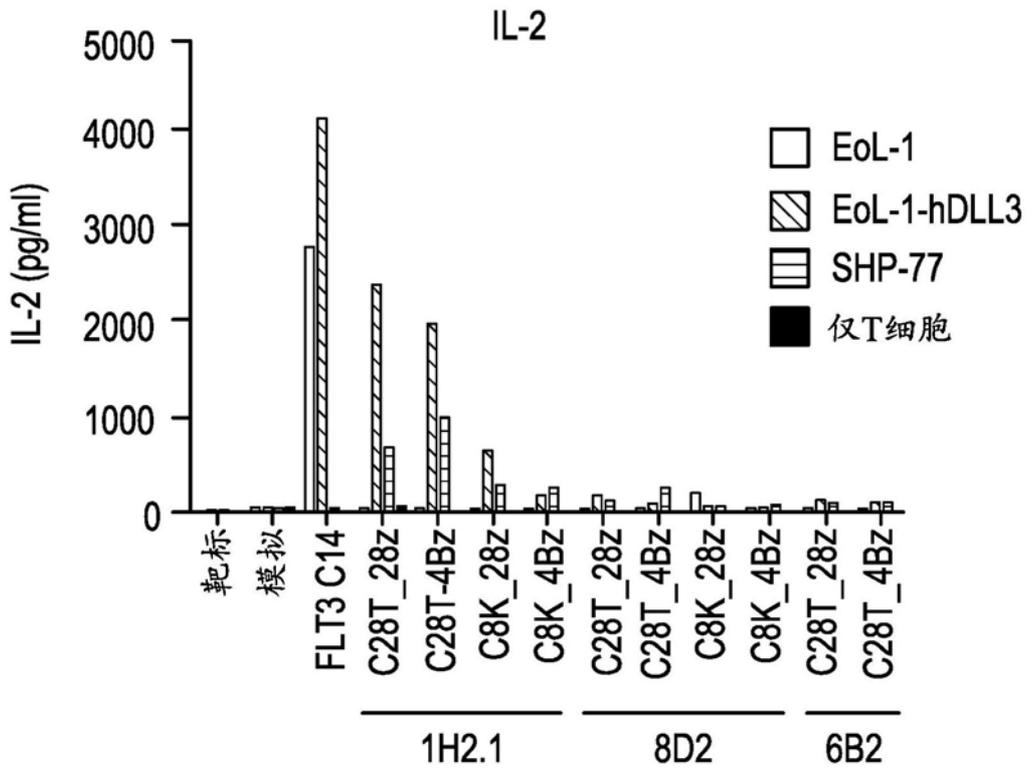


图3B

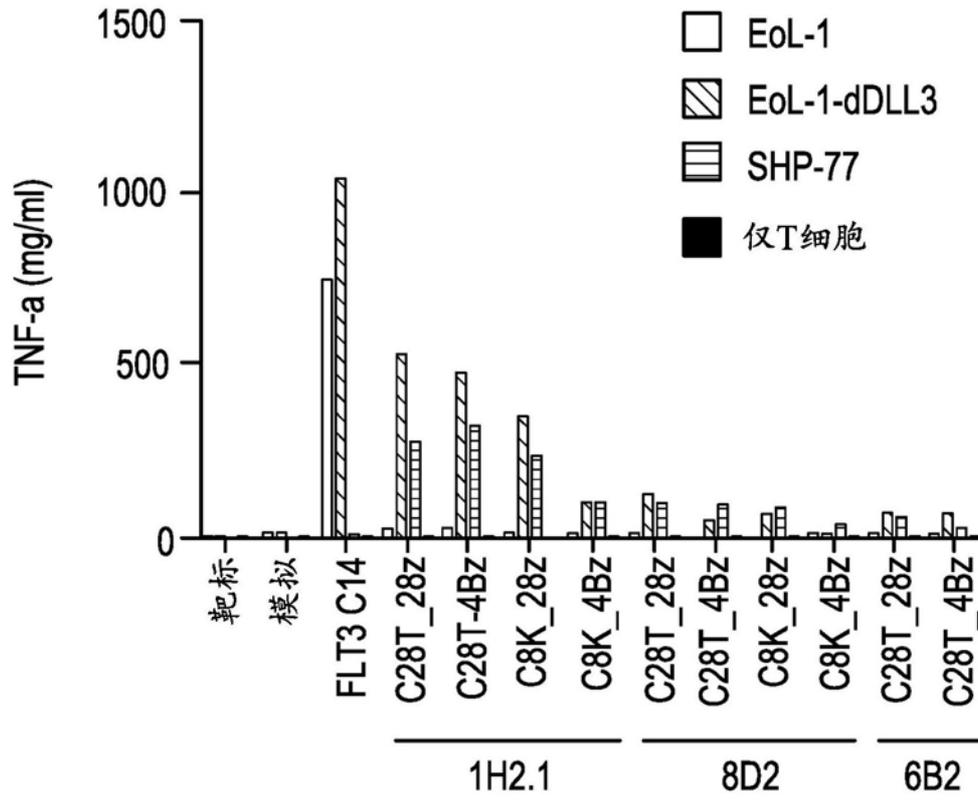


图3C

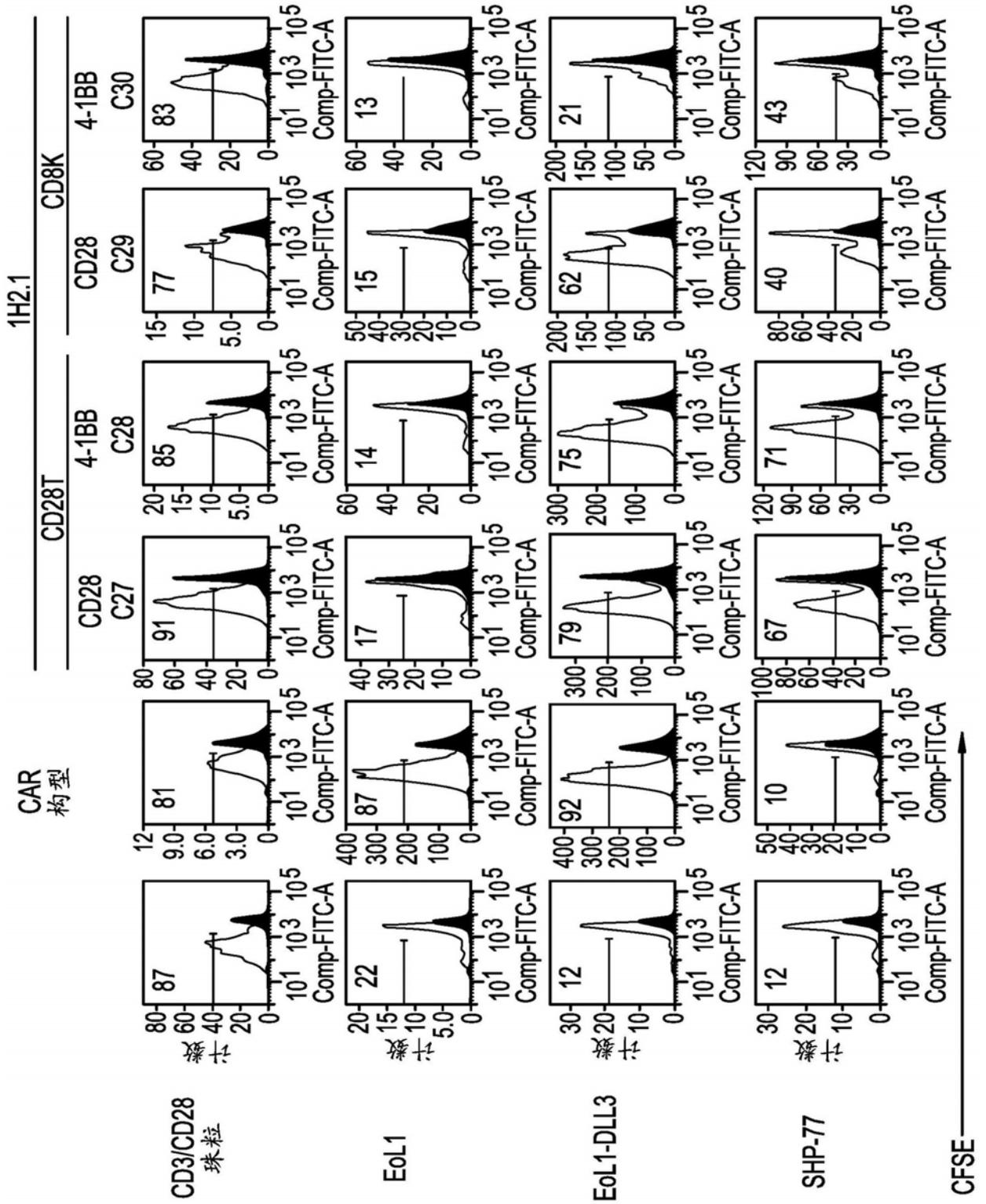


图4A

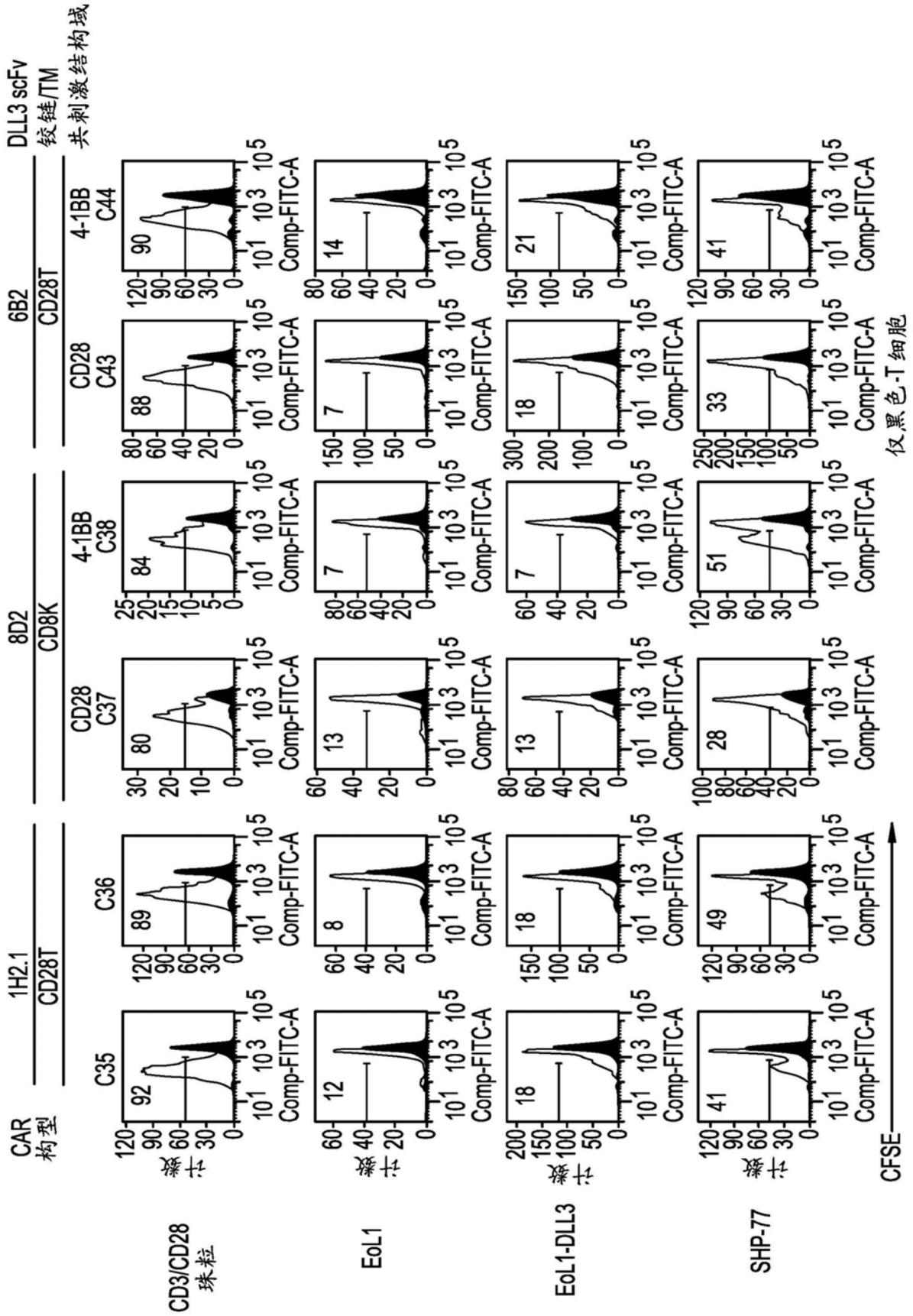


图4B

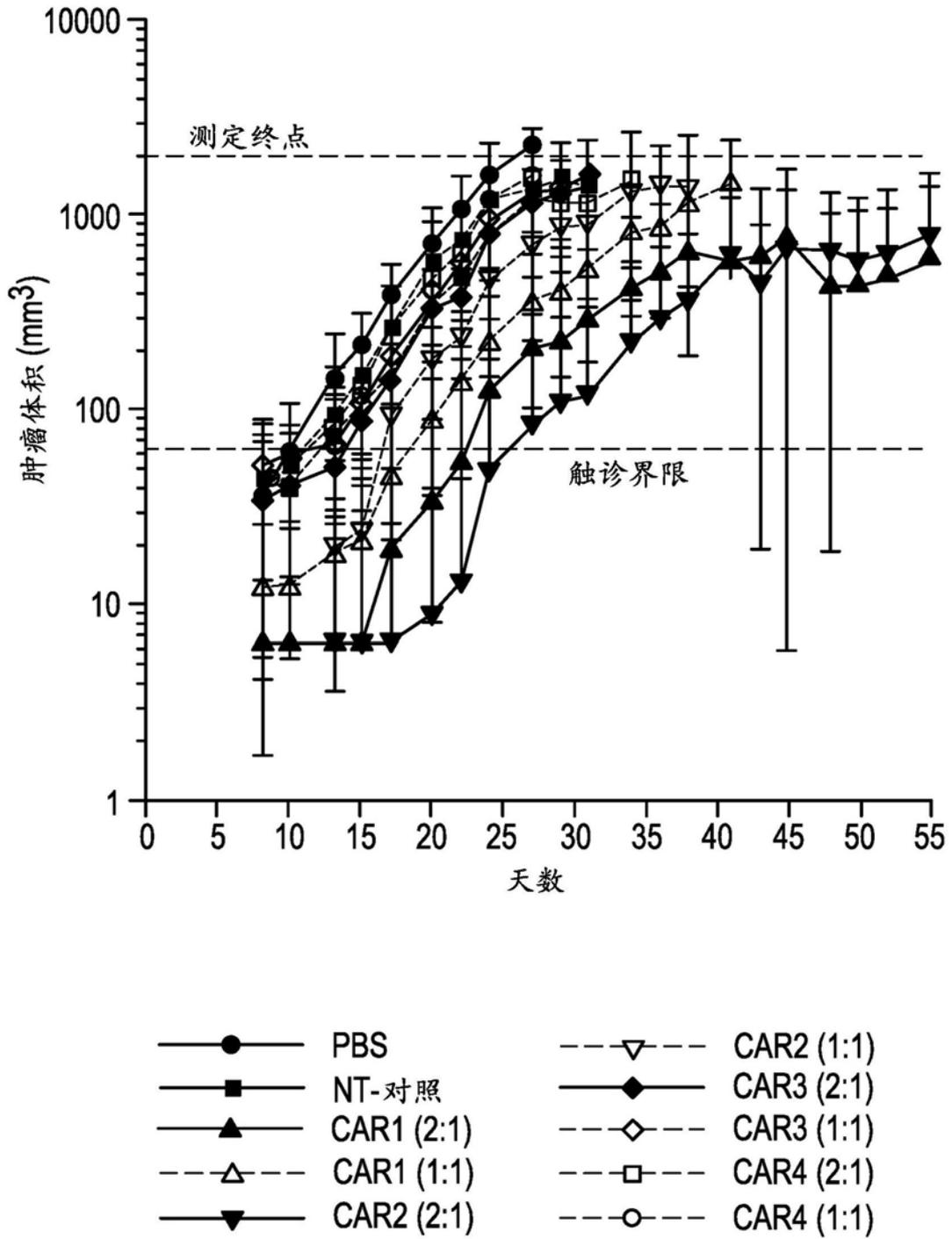
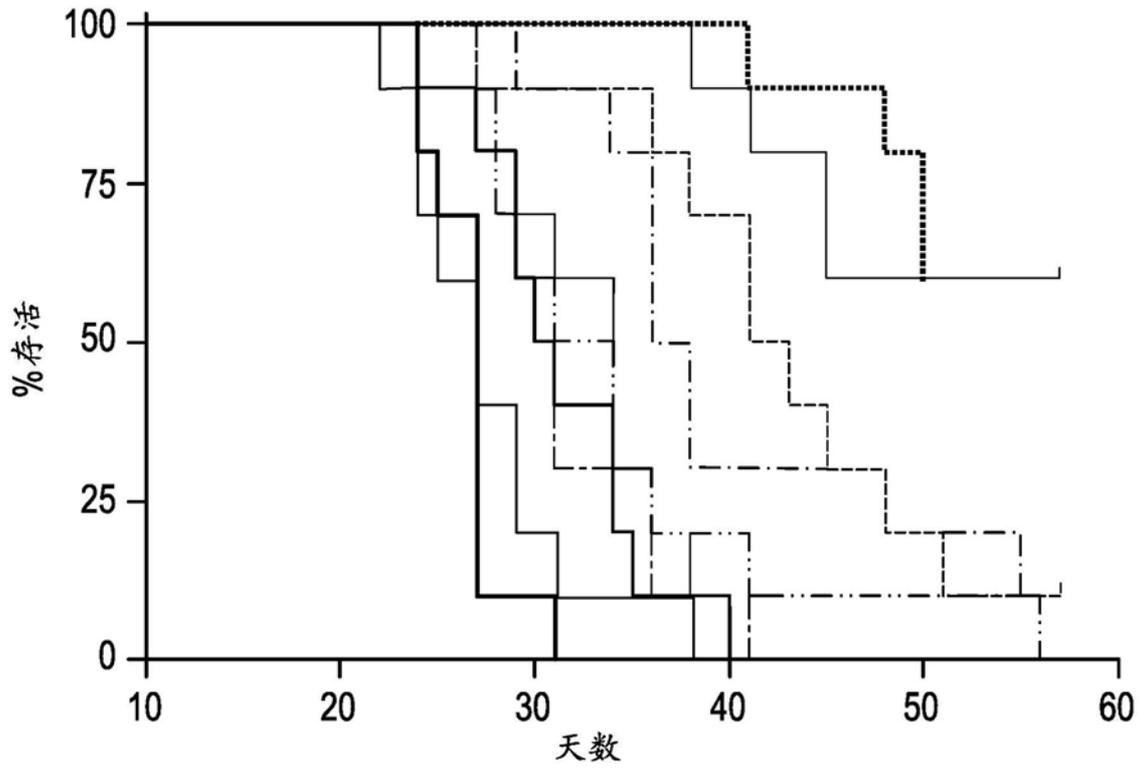


图5



- |       |            |       |            |
|-------|------------|-------|------------|
| ————— | PBS        | ..... | CAR3 (2:1) |
| ————— | NT-对照      | ----- | CAR3 (1:1) |
| ————— | CAR1 (2:1) | ————— | CAR4 (2:1) |
| ----- | CAR1 (1:1) | ----- | CAR4 (1:1) |
| ..... | CAR2 (2:1) |       |            |
| ----- | CAR2 (1:1) |       |            |

图6

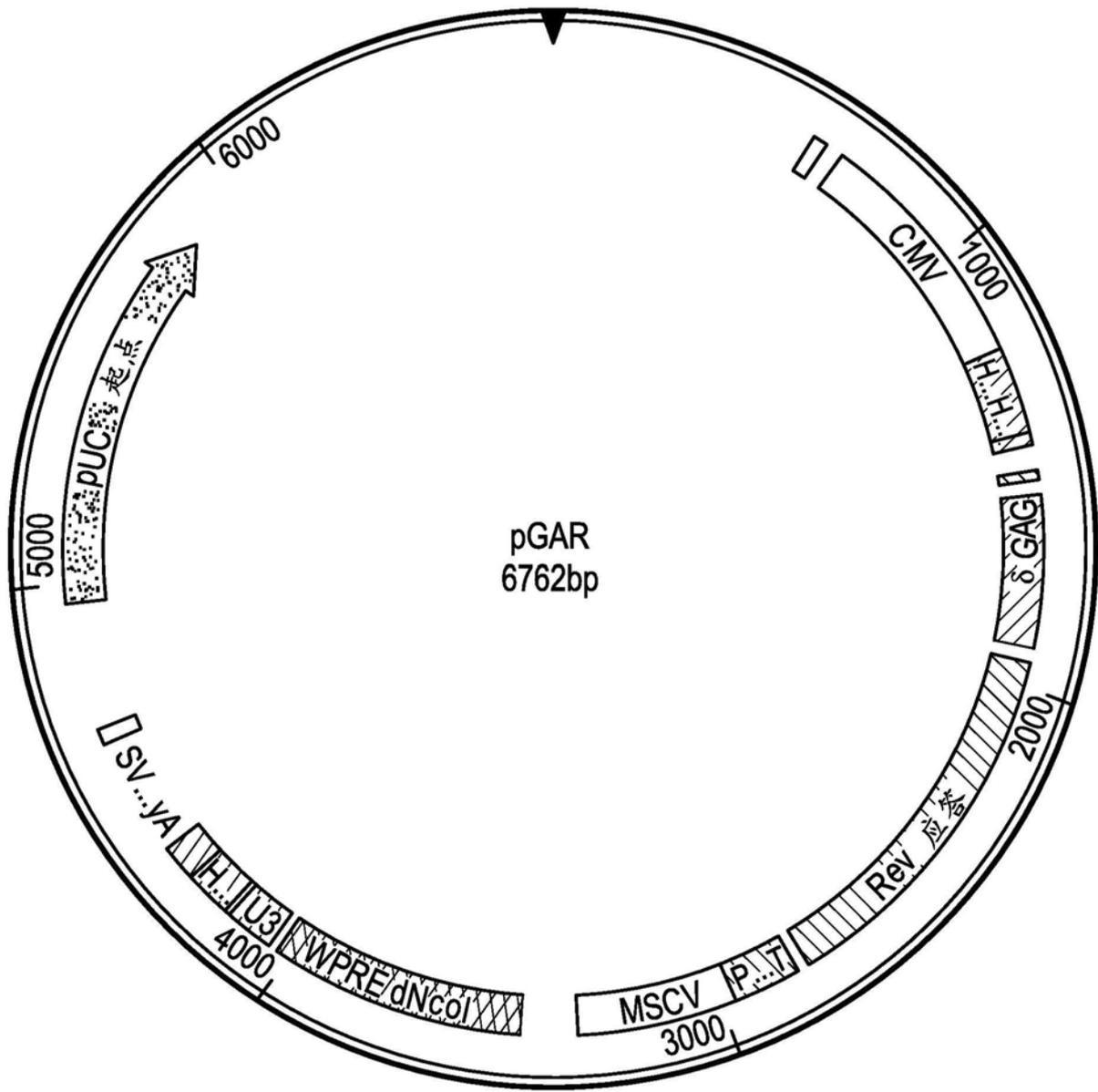


图7