



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117425491 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 19

(21) 申请号 202280040562.1

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22) 申请日 2022.05.03

专利代理师 黄革生 隋晓平

(30) 优先权数据

63/184,183 2021.05.04 US

63/239,293 2021.08.31 US

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/027463 2022.05.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/235662 EN 2022.11.10

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 K·布雷 F·德尔菲诺

D·迪利略

权利要求书11页 说明书58页

序列表57页 附图2页

(54) 发明名称

具有MAGE-A4特异性的嵌合抗原受体及其用途

(57) 摘要

MAGE-A4或黑素瘤相关抗原A4是X染色体上的癌症-睾丸抗原(CTA)。本公开提供了MAGE-A4特异性嵌合抗原受体、表达此类嵌合抗原受体的细胞以及分离的MAGE-A4特异性抗体。在某些实施方案中,表达本公开的这些嵌合抗原受体的工程化细胞能够抑制表达MAGE-A4的肿瘤的生长。本公开的工程化细胞可用于治疗上调的或诱导的MAGE-A4靶向免疫应答是期望的和/或治疗上有益的疾病和病症。例如,表达本公开的MAGE-A4特异性嵌合抗原受体的工程化细胞可用于治疗各种癌症。



1. 一种特异性结合HLA结合的黑素瘤相关抗原A4 (MAGE-A4) 的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR),其中所述LCVR包括包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCVR的互补决定区 (CDR),并且其中所述HCVR包括包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HCVR的CDR。

2. 根据权利要求1所述的抗原结合蛋白,其中所述LCVR包含与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗原结合蛋白,其中所述HCVR包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107具有至少95%同一性的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述MAGE-A4特异性抗原结合蛋白与SEQ ID NO:32的氨基酸286-294或其一部分相互作用。

5. 一种MAGE-A4特异性嵌合抗原受体 (CAR),所述MAGE-A4特异性CAR从N端至C端包含:(a) 包括抗MAGE-A4单链可变片段 (scFv) 结构域的细胞外配体结合结构域,所述抗MAGE-A4 scFv结构域包含轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR); (b) 铰链; (c) 跨膜结构域;和 (d) 包括4-1BB共刺激结构域或CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的细胞质结构域,其中所述LCVR包括:包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCVR的互补决定区 (CDR) 和包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HCVR的CDR。

6. 根据权利要求5所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述MAGE-A4特异性CAR从N端至C端包含:(a) 所述细胞外配体结合结构域; (b) 铰链; (c) 跨膜结构域;和 (d) 包括共刺激结构域和信号传导结构域的细胞质结构域。

7. 根据权利要求5所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗MAGE-A4 scFv结构域包含所述LCVR与所述HCVR之间的第一接头。

8. 根据权利要求5至7中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,还包含所述细胞外配体结合结构域与所述铰链之间的第二接头。

9. 根据权利要求8所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述第一接头包含选自SEQ ID NO:23-26的氨基酸序列,并且其中所述第二接头包含选自SEQ ID NO:23-26的氨基酸序列。

10. 根据权利要求9所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述第一接头包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且所述第二接头包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。

11. 根据权利要求5至10中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述铰链、所述跨膜结构域或两者来自CD8 α 多肽。

12. 根据权利要求5至11中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述共刺激结构域包括4-1BB共刺激结构域。

13. 根据权利要求5至11中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述共刺激结构域包括CD28共刺激结构域。

14. 根据权利要求5至10、12和13中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述铰链、所述跨膜结构域或两者来自CD28多肽。

15. 根据权利要求5至12中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述铰链包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

16. 根据权利要求5至12中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

17. 根据权利要求5至12中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

18. 根据权利要求5至10和12至14中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述铰链包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

19. 根据权利要求5至10、12至14和18中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

20. 根据权利要求5至10、12至14、18和19中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

21. 根据权利要求5至20中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述信号传导结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域。

22. 根据权利要求21所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述CD3 ζ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

23. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是MAGE-A4特异性抗体或其抗原结合片段。

24. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白或根据权利要求5至22中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗原结合蛋白或所述MAGE-A4特异性CAR包含HCVR内所含的三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述HCVR包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列。

25. 根据权利要求24所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,所述HCDR2包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,并且所述HCDR3包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。

26. 根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述HCVR包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

27. 根据权利要求25所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述HCVR包含SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列。

28. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白或根据权利要求5至22中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗原结合蛋白或所述MAGE-A4特异性CAR包含HCVR内所含的三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述HCVR包含SEQ ID NO:107中所示的氨基酸序列。

28. 根据权利要求28所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:109中所示的氨基酸序列,所述HCDR2包含SEQ ID NO:111中所示的氨基酸序列,并且所述HCDR3包含SEQ ID NO:113中所示的氨基酸序列。

29. 根据权利要求28所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述HCVR包含SEQ ID NO:107中所示的氨基酸序列。

30. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至29中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗原结合蛋白或所述MAGE-A4特异性CAR包含LCVR内所含的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述LCVR包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115中所示的氨基酸序列。

31. 根据权利要求30所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列,所述LCDR2包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,并且所述LCDR3包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。

32. 根据权利要求31所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述LCVR包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。

33. 根据权利要求30所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:117中所示的氨基酸序列,所述LCDR2包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,并且所述LCDR3包含SEQ ID NO:119中所示的氨基酸序列。

34. 根据权利要求33所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述LCVR包含SEQ ID NO:115中所示的氨基酸序列。

35. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白或根据权利要求5至22中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗原结合蛋白或所述MAGE-A4特异性CAR包含HCVR和LCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列,所述LCVR包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。

36. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白或根据权利要求5至22中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗原结合蛋白或所述MAGE-A4特异性CAR包含HCVR和LCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列,所述LCVR包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。

37. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白或根据权利要求5至22中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗原结合蛋白或所述MAGE-A4特异性CAR包含HCVR和LCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:107中所示的氨基酸序列,所述LCVR包含SEQ ID NO:115中所示的氨基酸序列。

38. 根据权利要求5所述的MAGE-A4特异性CAR,所述MAGE-A4特异性CAR包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

39. 根据权利要求5所述的MAGE-A4特异性CAR,所述MAGE-A4特异性CAR包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列。

40. 根据权利要求5所述的MAGE-A4特异性CAR,所述MAGE-A4特异性CAR包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列。

41. 根据权利要求5所述的MAGE-A4特异性CAR,所述MAGE-A4特异性CAR包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列。

42. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗原结合蛋白或所述MAGE-A4特异性CAR与SEQ ID NO:32的位置286-294处的一个或多个氨基酸特异性结合。

43. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述抗原结合蛋白或所述MAGE-A4特异性CAR与所述HLA的一个或多个氨基酸相互作用。

44. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至

41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37、42和43中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR,其中所述HLA是HLA-A2。

45.一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子编码根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

46.根据权利要求45所述的分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

47.根据权利要求45所述的分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:104的核苷酸序列。

48.一种载体,所述载体包含根据权利要求45至47中任一项所述的核酸分子。

49.根据权利要求48所述的载体,其中所述载体是DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

50.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是慢病毒载体。

51.一种细胞,所述细胞包含根据权利要求45至47中任一项所述的核酸分子或根据权利要求48至50中任一项所述的载体。

52.根据权利要求51所述的细胞,其中所述细胞是人T细胞。

53.一种工程化细胞,所述工程化细胞包含根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

54.根据权利要求53所述的工程化细胞,所述工程化细胞是免疫细胞。

55.根据权利要求54所述的工程化细胞,其中所述免疫细胞是免疫效应细胞。

56.根据权利要求55所述的工程化细胞,其中所述免疫效应细胞是T淋巴细胞。

57.根据权利要求56所述的工程化细胞,其中所述T淋巴细胞是炎性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞或辅助性T淋巴细胞。

58.根据权利要求57所述的工程化细胞,所述工程化细胞是CD8+细胞毒性T淋巴细胞。

59.根据权利要求53至58中任一项所述的工程化细胞,所述工程化细胞用于治疗表达MAGE-A4的癌症。

60.根据权利要求59所述的工程化细胞,其中所述表达MAGE-A4的癌症是多发性骨髓瘤。

61.根据权利要求59所述的工程化细胞,其中所述表达MAGE-A4的癌症是黑素瘤。

62.一种工程化人T细胞,所述工程化人T细胞包含嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体从N端至C端包含:(a)包括抗MAGE-A4单链可变片段(scFv)结构域的细胞外配体结合结构域,所述抗MAGE-A4scFv结构域包含轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR);(b)铰链;(c)跨膜结构域;和(d)包括4-1BB共刺激结构域或CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的细胞质结构域,其中所述LCVR包括:包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCVR的互补决定区(CDR)和包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HCVR的CDR。

63.根据权利要求62所述的工程化人T细胞,其中所述抗MAGE-A4 scFv与SEQ ID NO:32的位置286-294的一个或多个氨基酸残基特异性结合。

64. 根据权利要求62或63所述的工程化人T细胞,其中所述scFv结构域包括包含SEQ ID NO:2/10的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

65. 根据权利要求62或63所述的工程化人T细胞,其中所述scFv结构域包括包含SEQ ID NO:2/83的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

66. 根据权利要求62或63所述的工程化人T细胞,其中所述scFv结构域包括包含SEQ ID NO:107/115的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

67. 根据权利要求64或65所述的工程化人T细胞,其中所述HCVR包含三个重链CDR (HCDR1、HCDR2和HCDR3),并且所述LCVR包含三个轻链CDR (LCDR1、LCDR2和LCDR3),其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,所述HCDR2包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,所述HCDR3包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列,所述LCDR1包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列,所述LCDR2包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,并且所述LCDR3包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。

68. 根据权利要求66所述的工程化人T细胞,其中所述HCVR包含三个重链CDR (HCDR1、HCDR2和HCDR3),并且所述LCVR包含三个轻链CDR (LCDR1、LCDR2和LCDR3),其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:109中所示的氨基酸序列,所述HCDR2包含SEQ ID NO:111中所示的氨基酸序列,所述HCDR3包含SEQ ID NO:113中所示的氨基酸序列,所述LCDR1包含SEQ ID NO:117中所示的氨基酸序列,所述LCDR2包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,并且所述LCDR3包含SEQ ID NO:119中所示的氨基酸序列。

69. 根据权利要求62至68中任一项所述的工程化人T细胞,其中所述铰链包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

70. 根据权利要求62至69中任一项所述的工程化人T细胞,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

71. 根据权利要求62至70中任一项所述的工程化人T细胞,其中所述4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

72. 根据权利要求62至68中任一项所述的工程化人T细胞,其中所述铰链包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

73. 根据权利要求62至68和72中任一项所述的工程化人T细胞,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

74. 根据权利要求62至68、72和73中任一项所述的工程化人T细胞,其中所述CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

75. 根据权利要求62至74中任一项所述的工程化人T细胞,其中所述CD3 ζ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

76. 根据权利要求62所述的工程化人T细胞,所述工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的嵌合抗原受体。

77. 根据权利要求62所述的工程化人T细胞,所述工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的嵌合抗原受体。

78. 根据权利要求62所述的工程化人T细胞,所述工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的嵌合抗原受体。

79. 根据权利要求62所述的工程化人T细胞,所述工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:

121的氨基酸序列的嵌合抗原受体。

80. 一种药物组合物,所述药物组合物包含经基因修饰的人T细胞和药学上可接受的载体,其中所述经基因修饰的人T细胞包含根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

81. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求53至58中任一项所述的工程化细胞和药学上可接受的载体。

82. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求62至79中任一项所述的工程化人T细胞和药学上可接受的载体。

83. 根据权利要求80至82中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物用于治疗表达MAGE-A4的癌症。

84. 根据权利要求83所述的药物组合物,其中所述表达MAGE-A4的癌症是多发性骨髓瘤。

85. 根据权利要求83所述的药物组合物,其中所述表达MAGE-A4的癌症是黑素瘤。

86. 根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR、或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR、根据权利要求45至47中任一项所述的核酸分子、根据权利要求48至50中任一项所述的载体、根据权利要求51或52所述的细胞、根据权利要求53至58中任一项所述的工程化细胞或根据权利要求62至79中任一项所述的工程化人T细胞在制备用于治疗表达MAGE-A4的癌症的药物中的用途。

87. 根据权利要求86所述的用途,其中所述表达MAGE-A4的癌症是多发性骨髓瘤。

88. 根据权利要求86所述的用途,其中所述表达MAGE-A4的癌症是黑素瘤。

89. 一种增强受试者中的T淋巴细胞活性的方法,所述方法包括将T淋巴细胞引入到所述受试者中,所述T淋巴细胞包含根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

90. 一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括将治疗有效量的T淋巴细胞引入到所述受试者中,所述T淋巴细胞包含根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

91. 一种用于刺激受试者中T细胞介导的针对靶细胞群或组织的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的细胞,所述细胞经基因修饰以表达根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

92. 一种在受试者中提供抗肿瘤免疫的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的细胞,所述细胞经基因修饰以表达根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

93. 根据权利要求89至92中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

94. 根据权利要求89至93中任一项所述的方法,其中所述受试者患有多发性骨髓瘤、滑膜肉瘤、食道癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌或黑素瘤。

95. 根据权利要求94所述的方法,其中所述受试者患有多发性骨髓瘤。

96. 一种对细胞群进行工程化以表达特异性结合HLA结合的MAGE-A4的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性嵌合抗原受体(CAR)的方法,所述方法包括:

(a) 将编码根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR的核酸分子引入到免疫细胞群中;

(b) 在表达所述核酸分子的条件培养所述免疫细胞群;以及

(c) 分离在细胞表面处表达所述MAGE-A4特异性抗原结合蛋白的所述免疫细胞。

97. 根据权利要求96所述的方法,所述方法还包括在引入所述核酸分子之前从受试者获得所述免疫细胞群。

98. 一种治疗受试者的表达MAGE-A4的癌症的方法,所述方法包括:

(a) 对根据权利要求96或权利要求97所述的细胞群进行工程化;以及

(b) 将表达所述嵌合抗原受体的所述细胞群重新引入到所述受试者中。

99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述表达MAGE-A4的癌症是多发性骨髓瘤。

100. 一种分离的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含与HLA结合的黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)特异性结合的第一抗原结合结构域和与人CD3特异性结合的第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域包含重链可变区(A1-HCVR)中所含的三个重链互补决定区(CDR)(A1-HCDR1、A1-HCDR2和A1-HCDR3)和轻链可变区(A1-LCVR)中所含的三个轻链CDR(A1-LCDR1、A1-LCDR2和A1-LCDR3),并且所述第二抗原结合结构域包含重链可变区(A2-HCVR)中所含的三个重链CDR(A2-HCDR1、A2-HCDR2和A2-HCDR3)和轻链可变区(A2-LCVR)中所含的三个轻链CDR(A2-LCDR1、A2-LCDR2和A2-LCDR3),其中所述A1-HCVR包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述A1-LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述A2-HCVR包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列,并且所述A2-LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

101. 一种分离的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含与HLA结合的黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)特异性结合的第一抗原结合结构域和与人CD3特异性结合的第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域包含重链可变区(A1-HCVR)中所含的三个重链互补决定区(CDR)(A1-HCDR1、A1-HCDR2和A1-HCDR3)和轻链可变区(A1-LCVR)中所含的三个轻链CDR(A1-LCDR1、A1-LCDR2和A1-LCDR3),并且所述第二抗原结合结构域包含重链可变区(A2-HCVR)中所含的三个重链CDR(A2-HCDR1、A2-HCDR2和A2-HCDR3)和轻链可变区(A2-LCVR)中所含的三个轻链CDR(A2-LCDR1、A2-LCDR2和A2-LCDR3),其中所述A1-HCVR包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,所述A1-LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,所述A2-HCVR包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,并且所述A2-LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

102. 根据权利要求100或权利要求101所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白与SEQ ID NO:32的氨基酸286-294或其一部分相互作用。

103. 根据权利要求100或101所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白是CAR。

104. 根据权利要求100或101所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白是双特异性抗体。

105. 根据权利要求100至104中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白与SEQ ID NO:32的氨基酸286-294或其一部分相互作用。

106. 根据权利要求100至105中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白与CD3相互作用。

107. 根据权利要求100或权利要求102至106中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区(HCVR),所述HCVR包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:83具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

108. 根据权利要求100或权利要求102至106中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区(HCVR),所述HCVR包含与SEQ ID NO:55具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

109. 根据权利要求101至106中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区(HCVR),所述HCVR包含与SEQ ID NO:73具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

110. 一种分离的抗原结合蛋白,所述分离的抗原结合蛋白与根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR结合相同的表位。

111. 一种分离的抗原结合蛋白,所述分离的抗原结合蛋白与根据权利要求1至4和23中任一项所述的抗原结合蛋白、根据权利要求5至22和38至41中任一项所述的MAGE-A4特异性CAR或根据权利要求24至37和42至44中任一项所述的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR竞争结合。

112. 根据权利要求110或111所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白是CAR。

113. 根据权利要求110或111所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白是双特异性抗体。

114. 根据权利要求111至113中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白与SEQ ID NO:32的氨基酸286-294或其一部分相互作用。

115. 根据权利要求113或114所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白与CD3相互作用。

116. 根据权利要求100至115中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区(HCVR),所述HCVR包含三个重链CDR,即分别包含SEQ ID NO:4、6和8的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

117. 根据权利要求100或102至116中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含对应于所述双特异性抗体的另一臂的HCVR,所述HCVR包含三个重链CDR,即分别包含SEQ ID NO:57、59和61的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

118. 根据权利要求101至116中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含对应于所述双特异性抗体的另一臂的HCVR,所述HCVR包含三个重链CDR,所

述三个重链CDR分别包含SEQ ID NO:75、77和79的氨基酸序列。

119. 根据权利要求100至118中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包括包含与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)和/或包含与SEQ ID NO:63具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的LCVR。

120. 一种分离的重组抗体或其抗原结合片段,所述分离的重组抗体或其抗原结合片段与黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)多肽特异性结合,其中所述抗体具有以下特征中的一个或多个特征:

(a) 以小于约 2×10^{-9} M的EC50与所述MAGE-A4多肽结合;

(b) 相比于不与所述MAGE-A4多肽特异性结合的分离的重组抗体,展现出降低肿瘤细胞活力的能力;和/或

(c) 包含:(i) 重链可变区(HCVR)内所含的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述HCVR包含与表1中所示的HCVR具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列;

和(ii) 轻链可变区(LCVR)内所含的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述LCVR包含与表1中所示的LCVR具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。

121. 根据权利要求120所述的抗体或抗原结合片段,其中所述MAGE-A4多肽是HLA-A2结合的MAGE-A4多肽。

122. 根据权利要求120或121所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HCVR。

123. 根据权利要求120至122中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCVR。

124. 根据权利要求120至123中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:2/10、SEQ ID NO:83/10或SEQ ID NO:107/115的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

125. 根据权利要求120至124中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1结构域;

(b) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR2结构域;

(c) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR3结构域;

(d) 具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR1结构域;

(e) 具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LCDR2结构域;和

(f) 具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR3结构域。

126. 根据权利要求120至124中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 具有SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1结构域;

(b) 具有SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR2结构域;

(c) 具有SEQ ID NO:113的氨基酸序列的HCDR3结构域;

(d) 具有SEQ ID NO:117的氨基酸序列的LCDR1结构域;

(e) 具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LCDR2结构域;和

(f) 具有SEQ ID NO:119的氨基酸序列的LCDR3结构域。

127. 根据权利要求120至126中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段是IgG1抗体。

128. 根据权利要求120至126中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段是IgG4抗体。

129. 根据权利要求120至128中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体。

130. 一种分离的重组抗体或其抗原结合片段,所述分离的重组抗体或其抗原结合片段包含与黑素瘤相关抗原A4 (MAGE-A4) 多肽特异性结合的第一抗原结合结构域和与CD3多肽特异性结合的第二抗原结合结构域,其中:

(a) 所述结合MAGE-A4的第一抗原结合结构域(A1)包含三个重链互补决定区(A1-HCDR1、A1-HCDR2和A1-HCDR3)和三个轻链互补决定区(A1-LCDR1、A1-LCDR2和A1-LCDR3),其中

所述A1-HCDR1包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:109的氨基酸序列;

所述A1-HCDR2包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:111的氨基酸序列;

所述A1-HCDR3包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:113的氨基酸序列;

所述A1-LCDR1包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:117的氨基酸序列;

所述A1-LCDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

所述A1-LCDR3包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:119的氨基酸序列;并且

(b) 所述结合CD3的第二抗原结合结构域(A2)包含三个重链互补决定区(A2-HCDR1、A2-HCDR2和A2-HCDR3)和三个轻链互补决定区(A2-LCDR1、A2-LCDR2和A2-LCDR3),其中

所述A2-HCDR1包含SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:75的氨基酸序列;

所述A2-HCDR2包含SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:77的氨基酸序列;

所述A2-HCDR3包含SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:79的氨基酸序列;

所述A2-LCDR1包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:117的氨基酸序列;

所述A2-LCDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

所述A2-LCDR3包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:119的氨基酸序列。

131. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求120至130中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体或稀释剂。

132. 根据权利要求131所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。

133. 根据权利要求132所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂选自:抗肿瘤剂、类固醇和靶向疗法。

134. 一种多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码根据权利要求120至133中任一项所述的抗体的一个或多个HCVR和/或一个或多个LCVR的多核苷酸序列。

135. 一种载体,所述载体包含根据权利要求134所述的多核苷酸。

136. 一种细胞,所述细胞包含根据权利要求135所述的载体。

137. 一种治疗表达MAGE-A4的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用根据权利要求120至130中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求131至133中任一项所述的药物组合物。

138. 根据权利要求137所述的方法,其中所述药物组合物与第二治疗剂组合施用。

139. 根据权利要求138所述的方法,其中所述第二治疗剂选自:抗肿瘤剂、类固醇和靶向疗法。

具有MAGE-A4特异性的嵌合抗原受体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 USC§119(e) 要求于2021年5月4日提交的美国临时申请号63/184,183和于2021年8月31日提交的美国临时申请号63/239,293的权益,这些临时申请中的每一者以引用方式全文并入本文以用于任何目的。

[0003] 对序列表的参考

[0004] 本申请通过引用并入于2022年5月3日创建并含有95,050个字节的以计算机可读形式作为文件10901W001-Sequence.txt提交的序列表。

技术领域

[0005] 本公开提供了对黑素瘤相关抗原A4 (MAGE-A4) 具有特异性的抗体、嵌合抗原受体 (CAR) 和包含此类抗体和CAR的工程化细胞,以及它们的使用方法。

背景技术

[0006] MAGE-A4或黑素瘤相关抗原A4是X染色体上的癌症-睾丸抗原 (CTA)。MAGE-A4的功能未知,但它可能涉及细胞周期进程/调节、转录控制、细胞存活和/或细胞凋亡。例如,MAGE-A4的过表达已示出促进自发转化的口腔粘膜细胞的生长,并且抑制G1的细胞的生长停滞。

[0007] 许多不同组织学类型的肿瘤都大量表达MAGE-A4,如头颈鳞状细胞癌、肺癌(如非小细胞肺癌)、食管鳞状细胞癌、结肠癌、膀胱癌、粘膜和皮肤黑素瘤、卵巢癌(例如浆液性癌)和子宫癌,但在正常健康成人组织中,MAGE-A4表达仅限于睾丸。

[0008] MAGE-A4抗原引发免疫应答的能力以及其受限的表达模式使MAGE-A4成为癌症免疫疗法的良好候选者。

[0009] 应用于如癌症等复杂疾病的双重靶向抗体策略也代表了一种有前景的策略,由此多因素调节旨在改善疗效。CD3是与T细胞受体复合物 (TCR) 结合的在T细胞上表达的同源二聚体或异源二聚体抗原,并且是T细胞活化所需要的。功能性CD3由以下四种不同链中的两种的二聚缔合形成: ϵ 、 ζ 、 δ 和 γ 。具有MAGE-A4结合臂和CD3结合臂的双特异性抗体可用于增强抗肿瘤活性。

[0010] 涉及转移离体产生的自体抗原特异性T细胞的过继免疫疗法是治疗病毒感染和癌症的另一种有前景的策略。可通过基因工程利用抗原特异性T细胞的扩增或T细胞的重定向来产生用于过继免疫疗法的T细胞。

[0011] 已经通过转基因T细胞受体或嵌合抗原受体 (CAR) 的遗传转移成功地产生了T细胞中的新特异性。CAR是合成受体,由与单个融合分子中一个或多个信号传导结构域相关的靶向部分组成。通常,CAR的结合部分由单链抗体 (scFv) 的抗原结合结构域组成,包括通过柔性接头连接的单克隆抗体的轻链和重链可变片段。第一代CAR的信号传导结构域源自CD3 ζ 或Fc受体 γ 链的细胞质结构域。第一代CAR已示出成功地重定向T细胞的细胞毒性。然而,CAR未能在体内提供延长的扩增和抗肿瘤活性。已添加来自共刺激分子的信号传导结构域

以及跨膜域和铰链结构域以形成第二代和第三代CAR,从而导致一些成功的人体治疗性试验。例如,特异于B细胞分化抗原CD19的CAR重定向T细胞在治疗B细胞恶性肿瘤方面已示出显著功效,而TCR重定向T细胞在患有实体癌的患者中显已示出益处。Stauss等人描述了修改治疗性CAR和TCR的策略,用于治疗癌症,例如,增强抗原特异性效应子功能和限制工程化T细胞的毒性(Current Opinion in Pharmacology 2015,24:113-118)。

[0012] 对于基于双重靶向抗体策略和/或特异性结合MAGE-A4抗原的CAR的新靶向剂以及用于在治疗和诊断环境中生产和使用此类药剂的方法,都存在尚未满足的需求。

发明内容

[0013] 在一个方面,本公开提供了一种特异性结合HLA结合的黑素瘤相关抗原A4 (MAGE-A4)的抗原结合蛋白,其中该抗原结合蛋白包含轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR),其中该LCVR包括包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCVR的互补决定区(CDR),并且其中该HCVR包括包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HCVR的CDR。

[0014] 在一些实施方案中,LCVR包含与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCVR包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0015] 在一些情况下,抗原结合蛋白与SEQ ID NO:32的氨基酸286-294或其一部分相互作用。

[0016] 在一个方面,本公开提供了一种MAGE-A4特异性嵌合抗原受体(CAR),该MAGE-A4特异性CAR从N端至C端包含:(a)包括抗MAGE-A4单链可变片段(scFv)结构域的细胞外配体结合结构域,该抗MAGE-A4 scFv结构域包含轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR);(b)铰链;(c)跨膜结构域;和(d)包括4-1BB共刺激结构域或CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的细胞质结构域,其中该LCVR包括:包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCVR的互补决定区(CDR)和包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HCVR的CDR。

[0017] 在一些实施方案中,MAGE-A4特异性CAR从N端至C端包含:(a)细胞外配体结合结构域;(b)铰链;(c)跨膜结构域;和(d)包括共刺激结构域和信号传导结构域的细胞质结构域。在一些情况下,抗MAGE-A4 scFv结构域包含LCVR与HCVR之间的第一接头。

[0018] 在一些实施方案中,MAGE-A4特异性CAR还包含细胞外配体结合结构域与铰链之间的第二接头。在一些情况下,第一接头包含选自SEQ ID NO:23-26的氨基酸序列,并且第二接头包含选自SEQ ID NO:23-26的氨基酸序列。在一些情况下,第一接头包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且第二接头包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。

[0019] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,铰链、跨膜结构域或两者来自CD8 α 多肽。

[0020] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,共刺激结构域包括4-1BB共刺激结构域。

[0021] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,共刺激结构域包括CD28共刺激结构域。

[0022] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,铰链、跨膜结构域或两者来自CD28多肽。

[0023] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0024] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸

序列。

[0025] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0026] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0027] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0028] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

[0029] 在MAGE-A4特异性CAR的各种实施方案中,信号传导结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域。在一些情况下,CD3 ζ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0030] 在各种实施方案中,抗原结合蛋白是MAGE-A4特异性抗体或其抗原结合片段。

[0031] 在一些情况下,上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR包含HCVR内所含的三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3),该HCVR包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列。在一些情况下,HCDR1包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,并且HCDR3包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。在一些情况下,HCVR包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些情况下,HCVR包含SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列。在一些情况下,抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR包含HCVR内所含的三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3),该HCVR包含SEQ ID NO:107中所示的氨基酸序列。在一些情况下,HCDR1包含SEQ ID NO:109中所示的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:111中所示的氨基酸序列,并且HCDR3包含SEQ ID NO:113中所示的氨基酸序列。在一些情况下,HCVR包含SEQ ID NO:107中所示的氨基酸序列。

[0032] 在一些情况下,上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR包含LCVR内所含的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),该LCVR包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115中所示的氨基酸序列。在一些情况下,LCDR1包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。在一些情况下,LCVR包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。在一些情况下,LCDR1包含SEQ ID NO:117中所示的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:119中所示的氨基酸序列。在一些情况下,LCVR包含SEQ ID NO:115中所示的氨基酸序列。

[0033] 在一些情况下,上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR包含HCVR和LCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列,该LCVR包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。在一些情况下,上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR包含HCVR和LCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列,该LCVR包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。在一些情况下,上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR包含HCVR和LCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:107中所示的氨基酸序列,该LCVR包含SEQ ID NO:115中所示的氨基酸序列。

[0034] 在各种实施方案中,MAGE-A4特异性CAR包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在各种实施方案中,MAGE-A4特异性CAR包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列。在各种实施方案中,MAGE-A4特异性CAR包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列。在各种实施方案中,MAGE-A4特异性

CAR包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列。

[0035] 在各种实施方案中,上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR与SEQ ID NO:32的位置286-294处的一个或多个氨基酸特异性结合。在各种实施方案中,上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR与HLA的一个或多个氨基酸相互作用。在一些情况下,HLA是HLA-A2。

[0036] 在一个方面,本公开提供了一种分离的核酸分子,该分离的核酸分子编码上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。在一些情况下,分离的核酸分子包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。在一些情况下,分离的核酸分子包含SEQ ID NO:104的核苷酸序列。

[0037] 在一个方面,本公开提供了一种载体,该载体包含上文或本文所讨论的核酸分子。在一些情况下,载体是DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。在一些实施方案中,载体是慢病毒载体。

[0038] 在一个方面,本公开提供了一种细胞,该细胞包含上文或本文所讨论的核酸分子。在一些情况下,细胞是人T细胞。

[0039] 在一个方面,本公开提供了一种工程化细胞,该工程化细胞包含上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。在一些情况下,工程化细胞是免疫细胞。在一些情况下,免疫细胞是免疫效应细胞。在一些情况下,免疫效应细胞是T淋巴细胞。在一些情况下,T淋巴细胞是炎性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞或辅助性T淋巴细胞。在一些情况下,工程化细胞是CD8+细胞毒性T淋巴细胞。在各种实施方案中,工程化细胞用于治疗表达MAGE-A4的癌症。在一些情况下,表达MAGE-A4的癌症是多发性骨髓瘤。在一些情况下,表达MAGE-A4的癌症是黑色素瘤。

[0040] 在一个方面,本公开提供了一种工程化人T细胞,该工程化人T细胞包含嵌合抗原受体,该嵌合抗原受体从N端至C端包含:(a)包括抗MAGE-A4单链可变片段(scFv)结构域的细胞外配体结合结构域,该抗MAGE-A4 scFv结构域包含轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR);(b)铰链;(c)跨膜结构域;和(d)包括4-1BB共刺激结构域或CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的细胞质结构域,其中该LCVR包括:包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCVR的互补决定区(CDR)和包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HCVR的CDR。

[0041] 在工程化人T细胞的各种实施方案中,抗MAGE-A4 scFv与SEQ ID NO:32的位置286-294的一个或多个氨基酸残基特异性结合。在一些情况下,scFv结构域包括包含SEQ ID NO:2/10的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在一些情况下,scFv结构域包括包含SEQ ID NO:2/83的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在一些情况下,scFv结构域包括包含SEQ ID NO:107/115的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在一些实施方案中,HCVR包含三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3),并且LCVR包含三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),其中HCDR1包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。在一些情况下,HCVR包含三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3),并且LCVR包含三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),其中HCDR1包含SEQ ID NO:109中所示

的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:111中所示的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:113中所示的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:117中所示的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:119中所示的氨基酸序列。在一些情况下,铰链包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些情况下,跨膜结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在一些情况下,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一些情况下,铰链包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一些情况下,跨膜结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在一些情况下,CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。在一些情况下,CD3 ζ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0042] 在各种实施方案中,工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的嵌合抗原受体。在各种实施方案中,工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的嵌合抗原受体。在各种实施方案中,工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的嵌合抗原受体。在各种实施方案中,工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的嵌合抗原受体。

[0043] 在一个方面,本公开提供了一种药物组合物,该药物组合物包含经基因修饰的人T细胞和药学上可接受的载体,其中该经基因修饰的人T细胞包含上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。在一些情况下,药物组合物包含如上文或本文所讨论的工程化细胞和药学上可接受的载体。在一些情况下,药物组合物包含如上文或本文所讨论的工程化人T细胞和药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物用于治疗表达MAGE-A4的癌症。在一些情况下,表达MAGE-A4的癌症是多发性骨髓瘤。在一些情况下,表达MAGE-A4的癌症是黑素瘤。

[0044] 在一个方面,本公开提供了如上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR、核酸分子、载体、细胞、工程化细胞或工程化人T细胞在制备用于治疗表达MAGE-A4的癌症的药物中的用途。在一些情况下,表达MAGE-A4的癌症是多发性骨髓瘤。在一些情况下,表达MAGE-A4的癌症是黑素瘤。

[0045] 在一个方面,本公开提供了一种增强受试者中的T淋巴细胞活性的方法,该方法包括将T淋巴细胞引入到该受试者中,该T淋巴细胞包含上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

[0046] 在一个方面,本公开提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括将治疗有效量的T淋巴细胞引入到该受试者中,该T淋巴细胞包含上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

[0047] 在一个方面,本公开提供了一种用于刺激受试者中T细胞介导的针对靶细胞群或组织的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的细胞,该细胞经基因修饰以表达上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

[0048] 在一个方面,本公开提供了一种在受试者中提供抗肿瘤免疫的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的细胞,该细胞经基因修饰以表达上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR。

[0049] 在上文或本文所讨论的各种方法中的任一种中,受试者可以是人。在一些实施方案中,受试者患有多发性骨髓瘤、滑膜肉瘤、食道癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌或黑素瘤。在一些实施方案中,受试者患有多发性骨髓瘤。

[0050] 在一个方面,本公开提供了一种对细胞群进行工程化以表达上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR的方法,该方法包括:(a)将编码上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR的核酸分子引入到免疫细胞群中;(b)在表达所述核酸分子的条件培养该免疫细胞群;以及(c)分离在细胞表面处表达所述MAGE-A4特异性抗原结合蛋白的免疫细胞。在一些情况下,该方法还包括在引入核酸分子之前从受试者获得免疫细胞群。

[0051] 在一个方面,本公开提供了一种治疗受试者的表达MAGE-A4的癌症的方法,该方法包括:(a)对如上文或本文所讨论的细胞群进行工程化;以及(b)将表达嵌合抗原受体的该细胞群重新引入到该受试者中。在一些情况下,表达MAGE-A4的癌症是多发性骨髓瘤。

[0052] 在一个方面,本公开提供了一种分离的抗原结合蛋白,其中该抗原结合蛋白包含与HLA结合的黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)特异性结合的第一抗原结合结构域和与人CD3特异性结合的第二抗原结合结构域,其中该第一抗原结合结构域包含重链可变区(A1-HCVR)中所含的三个重链互补决定区(CDR)(A1-HCDR1、A1-HCDR2和A1-HCDR3)和轻链可变区(A1-LCVR)中所含的三个轻链CDR(A1-LCDR1、A1-LCDR2和A1-LCDR3),并且该第二抗原结合结构域包含重链可变区(A2-HCVR)中所含的三个重链CDR(A2-HCDR1、A2-HCDR2和A2-HCDR3)和轻链可变区(A2-LCVR)中所含的三个轻链CDR(A2-LCDR1、A2-LCDR2和A2-LCDR3),其中A1-HCVR包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,A1-LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,A2-HCVR包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列,并且A2-LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0053] 在一个方面,本公开提供了一种分离的抗原结合蛋白,其中该抗原结合蛋白包含与HLA结合的黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)特异性结合的第一抗原结合结构域和与人CD3特异性结合的第二抗原结合结构域,其中该第一抗原结合结构域包含重链可变区(A1-HCVR)中所含的三个重链互补决定区(CDR)(A1-HCDR1、A1-HCDR2和A1-HCDR3)和轻链可变区(A1-LCVR)中所含的三个轻链CDR(A1-LCDR1、A1-LCDR2和A1-LCDR3),并且该第二抗原结合结构域包含重链可变区(A2-HCVR)中所含的三个重链CDR(A2-HCDR1、A2-HCDR2和A2-HCDR3)和轻链可变区(A2-LCVR)中所含的三个轻链CDR(A2-LCDR1、A2-LCDR2和A2-LCDR3),其中A1-HCVR包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,A1-LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,A2-HCVR包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,并且A2-LCVR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0054] 在上文或本文所讨论的分离的抗原结合蛋白的各种实施方案中,抗原结合蛋白与SEQ ID NO:32的氨基酸286-294或其一部分相互作用。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白是CAR。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白是双特异性抗体。在一些实施方案中,分离的抗原结合蛋白与CD3相互作用。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白包含重链可变区(HCVR),该HCVR包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:83具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白包含重链可变区(HCVR),该HCVR包含与SEQ ID NO:55具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白包含重链可变区(HCVR),该HCVR包含与SEQ ID NO:73具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0055] 在一个方面,本公开提供了一种分离的抗原结合蛋白,该分离的抗原结合蛋白与上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR结合相同的表位。在一个方面,本公开提供了一种分离的抗原结合蛋白,该分离的抗原结合蛋白与上文或本文所讨论的抗原结合蛋白或MAGE-A4特异性CAR竞争结合。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白是CAR。在一

些情况下,分离的抗原结合蛋白是双特异性抗体。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白与SEQ ID NO:32的氨基酸286-294或其一部分相互作用。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白与CD3相互作用。在一些实施方案中,分离的抗原结合蛋白包含重链可变区(HCVR),该HCVR包含三个重链CDR,即分别包含SEQ ID NO:4、6和8的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施方案中,分离的抗原结合蛋白包含对应于双特异性抗体的另一臂的HCVR,该HCVR包含三个重链CDR,即分别包含SEQ ID NO:57、59和61的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施方案中,分离的抗原结合蛋白包含对应于双特异性抗体的另一臂的HCVR,该HCVR包含三个重链CDR,这三个重链CDR分别包含SEQ ID NO:75、77和79的氨基酸序列。在一些情况下,分离的抗原结合蛋白包括包含与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)和/或包含与SEQ ID NO:63具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的LCVR。

[0056] 在一个方面,本公开提供了一种分离的重组抗体或其抗原结合片段,该分离的重组抗体或其抗原结合片段与黑素瘤相关抗原A4(MAGE-A4)多肽特异性结合,其中该抗体具有以下特征中的一个或多个特征:(a)以小于约 2×10^{-9} M的EC50与该MAGE-A4多肽结合;(b)相比于不与MAGE-A4多肽特异性结合的分离的重组抗体,展现出降低肿瘤细胞活力的能力;和/或(c)包含:(i)重链可变区(HCVR)内所含的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1、HCDR2和HCDR3),该HCVR包含与表1中所示的HCVR具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区(LCVR)内所含的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),该LCVR包含与表1中所示的LCVR具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。

[0057] 在与MAGE-A4多肽特异性结合的分离的重组抗体或其抗原结合片段的一些实施方案中,MAGE-A4多肽是HLA-A2结合的MAGE-A4多肽。在一些情况下,分离的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HCVR。在一些情况下,分离的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的LCVR。在一些情况下,分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:2/10、SEQ ID NO:83/10或SEQ ID NO:107/115的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

[0058] 在一个方面,本公开提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1结构域;(b)具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR2结构域;(c)具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR3结构域;(d)具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR1结构域;(e)具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LCDR2结构域;和(f)具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR3结构域。

[0059] 在一个方面,本公开提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a)具有SEQ ID NO:109的氨基酸序列的HCDR1结构域;(b)具有SEQ ID NO:111的氨基酸序列的HCDR2结构域;(c)具有SEQ ID NO:113的氨基酸序列的HCDR3结构域;(d)具有SEQ ID NO:117的氨基酸序列的LCDR1结构域;(e)具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LCDR2结构域;和(f)具有SEQ ID NO:119的氨基酸序列的LCDR3结构域。

[0060] 在上文或本文所讨论的分离的抗体或其抗原结合片段的各种实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段是IgG1抗体或IgG4抗体。在一些情况下,分离的抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体。

[0061] 在一个方面,本公开提供了一种分离的重组抗体或其抗原结合片段,该分离的重

组抗体或其抗原结合片段包含与黑素瘤相关抗原A4 (MAGE-A4) 多肽特异性结合的第一抗原结合结构域和与CD3多肽特异性结合的第二抗原结合结构域,其中:(a)所述结合MAGE-A4的第一抗原结合结构域(A1)包含三个重链互补决定区(A1-HCDR1、A1-HCDR2和A1-HCDR3)和三个轻链互补决定区(A1-LCDR1、A1-LCDR2和A1-LCDR3),其中:A1-HCDR1包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:109的氨基酸序列;A1-HCDR2包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:111的氨基酸序列;A1-HCDR3包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:113的氨基酸序列;A1-LCDR1包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:117的氨基酸序列;A1-LCDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;A1-LCDR3包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:119的氨基酸序列;并且(b)所述结合CD3的第二抗原结合结构域(A2)包含三个重链互补决定区(A2-HCDR1、A2-HCDR2和A2-HCDR3)和三个轻链互补决定区(A2-LCDR1、A2-LCDR2和A2-LCDR3),其中:A2-HCDR1包含SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:75的氨基酸序列;A2-HCDR2包含SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:77的氨基酸序列;A2-HCDR3包含SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:79的氨基酸序列;A2-LCDR1包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:117的氨基酸序列;A2-LCDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;A2-LCDR3包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:119的氨基酸序列。

[0062] 在一个方面,本公开提供了一种药物组合物,该药物组合物包含如上文或本文所讨论的分离的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体或稀释剂。在一些情况下,药物组合物还包含第二治疗剂。在一些情况下,第二治疗剂选自:抗肿瘤剂、类固醇和靶向疗法。

[0063] 在一个方面,本发明提供了一种包含编码如上文或本文所讨论的抗体的一个或多个HCVR和/或一个或多个LCVR的多核苷酸序列的多核苷酸分子、一种包含该多核苷酸的载体以及一种包含该载体的细胞。

[0064] 在一个方面,本公开提供了一种治疗表达MAGE-A4的癌症的方法,该方法包括向受试者施用如上文或本文所讨论的抗体或抗原结合片段或如上文或本文所讨论的药物组合物。在一些情况下,药物组合物与第二治疗剂组合施用。在一些情况下,第二治疗剂选自:抗肿瘤剂、类固醇和靶向疗法。

[0065] 通过阅读随后的具体实施方式,其他实施方案将变得显而易见。

附图说明

[0066] 图1示出了用于表达嵌合抗原受体(CAR)构建体的示例性核苷酸构建体。该示例性核苷酸构建体包含抗MAGE-A4 VL-接头-VH scFv、人CD8铰链和跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域、CD3 ζ 信号传导结构域和任选的用于跟踪CAR转导的细胞的IRES:eGFP序列。

[0067] 图2示出了本公开的示例性双特异性抗体。该示例性双特异性抗体由能够与MAGE-A4相互作用的一个HCVR(抗MAGE-A4臂)和能够与CD3相互作用的另一个HCVR(抗CD3臂)组成。在代表性示例中,LCVR是共有的(例如,两者均对应于已知为杂乱的或与多种重链臂有效配对的抗CD3抗体或抗体轻链)。

具体实施方式

[0068] 应当理解,本文所述的发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因此方法和条件可以变化。还应理解,本文所使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,而不旨在是限

制性的,因为本发明的范围将仅由所附的权利要求限制。任何实施方案或实施方案的特征可以彼此组合,并且此类组合明确地涵盖在本发明的范围内。上文或本文所讨论的任何特定值可以与上文或本文所讨论的另一个相关值组合以列举具有表示范围的上端和下端的值的范围,并且此类范围涵盖在本公开的范围之内。

[0069] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。如本文所使用的,当用于提及具体所列举的数值时,术语“约”意指数值可以与所列举的值相差不超过1%。例如,如本文所使用的,表述“约100”包括99和101以及其之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0070] 尽管在本发明的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。

[0071] 定义

[0072] 如本文所使用的,术语“MAGE-A4”是指黑素瘤相关抗原A4。MAGE-A4是由多种不同的肿瘤细胞表达的细胞内蛋白。如本文所使用的,除非指定为来自非人物种(例如,“小鼠MAGE-A4”、“猴MAGE-A4”等),否则“MAGE-A4”是指人MAGE-A4蛋白。人MAGE-A4蛋白具有SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:31的多核酸序列。提及MAGE-A4多肽的特定区域(例如,MAGE-A4 286-294)是相对于SEQ ID NO:32而言的。如本文所使用的,术语“MAGE-A4 286-294”、“MAGE-A4 (286-294)”和“MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄”可以互换使用。MAGE-A4 (286-294) (KVLEHVVRV)的多肽序列作为SEQ ID NO:33给出。

[0073] 如本文所使用的,“结合MAGE-A4的抗体”或“抗MAGE-A4抗体”包括特异性识别至少MAGE-A4的抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,结合MAGE-A4的抗体与MAGE-A4的氨基酸286-294相互作用。如本文所公开的,“结合MAGE-A4的抗体”或“抗MAGE-A4抗体”还可能能够特异性识别其他MAGE-A4相关肽(例如,预测与HLA-A2形成复合物的MAGE-A4相关肽)。此外,结合MAGE-A4的抗体还能够结合一种或多种另外的配体,例如,如果抗体被格式化为双特异性抗体的话。在某些实施方案中,抗MAGE-A4抗体可被格式化为与MAGE-A4和CD3两者结合的双特异性抗体。

[0074] 术语“配体结合结构域”和“抗原结合结构域”在本文中可互换使用,并且是指嵌合抗原受体或对应抗体中与预先确定的抗原(例如,MAGE-A4)特异性结合的那一部分。提及“对应抗体”是指嵌合抗原受体或双特异性抗体中使用的CDR或可变区(重链可变区(缩写为HCVR或VH)和轻链可变区(缩写为LCVR或VL))所来源的抗体。例如,实施例讨论的嵌合抗原受体构建体包括具有源自抗MAGE-A4抗体的可变区的scFv。这种抗MAGE-A4抗体是相应嵌合抗原受体的“对应抗体”。

[0075] 如本文所使用的,术语“抗体”(其包括“双特异性抗体”)意指包含与特定抗原(例如,MAGE-A4)特异性结合或相互作用的至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。在一些实施方案中,抗体可与MHC结合的多肽(如HLA结合的多肽)结合或相互作用。在本公开的上下文中,在一些实施方案中,抗体可与HLA-A2结合的多肽(如由HLA-A2呈递的MAGE-A4多肽(例如,MAGE-A4 286-294))结合。术语“抗体”(其包括“双特异性抗体”)包括包含四条多肽链(通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)的免疫球蛋白分子以及它们的多聚体(例如,IgM)。然而,仅由重链组成(即,缺乏轻链)的免疫球蛋白分子

也涵盖在术语“抗体”的定义内。术语“抗体”还包括由四条多肽链(通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)组成的免疫球蛋白分子。每个重链(本文缩写为HC)包括重链可变区(本文缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 。每个轻链(本文缩写为LC)包括轻链可变区(本文缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域(C_L1)。可以将 V_H 区和 V_L 区进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着更保守的被称作框架区(FR)的区域。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR构成,按以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本公开的不同实施方案中,抗MAGE-A4抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是天然的或经人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0076] 在本发明的某些实施方案中,抗体是双特异性抗体。例如,在某些实施方案中,通过利用高亲和力(7195P)CD3臂生成bsb6054或利用中等亲和力(7221G)CD3臂生成bsAb6043,将抗MAGE-A4抗体(例如,mAbM31339N2)重新格式化为双特异性抗体(例如,抗MAGE-A4×抗CD3)。

[0077] 如本文所使用的,术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所使用的,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或经基因工程化的多肽或糖蛋白,其特异性结合抗原以形成复合物。如本文所使用的,“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指保留与MAGE-A4(或MAGE-A4相关肽)和/或CD3特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术从完整抗体分子衍生,如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变以及任选地恒定结构域的DNA的重组基因工程技术。此类DNA是已知的和/或易于从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)获得,或可以合成。可以通过化学方法或通过分子生物学技术对DNA进行测序和操作,例如,将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型、或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0078] 抗原结合片段的非限制性示例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii) 最小识别单元,这些最小识别单元由模拟抗体高变区(例如,分离的互补决定区(CDR),如CDR3肽)或受限的FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成。其他工程分子,如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等),小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼变异IgNAR结构域也涵盖在如本文所使用的表述“抗原结合片段”内。

[0079] 抗体的抗原结合片段通常包括至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成,并且将通常包括与一个或多个框架序列相邻或在所述框架内的至少一个CDR。在具有与 V_L 结构域相关联的 V_H 结构域的抗原结合片段中, V_H 结构域和 V_L 结构域可以以任何合适的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体,并且包含 V_H - V_H 、 V_H - V_L 或 V_L - V_L 二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体 V_H 或 V_L 结构域。

[0080] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以含有共价连接到至少一个恒定结构域的至少一个可变结构域。可在本公开的抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括:(i) V_H - C_H1 ;(ii) V_H - C_H2 ;(iii) V_H - C_H3 ;(iv) V_H - C_H1 - C_H2 ;(v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;(vi) V_H - C_H2 - C_H3 ;(vii) V_H - C_L ;(viii) V_L - C_H1 ;(ix) V_L - C_H2 ;(x) V_L - C_H3 ;(xi)

$V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; 以及 (xiv) V_L-C_L 。在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包括上文所列的任何示例性构型)中,可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分铰链或接头区连接。铰链区可以由至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成,这些氨基酸导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,本公开的抗体的抗原结合片段可以包括上文所列出的任何可变结构域和恒定结构域构型的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体),其彼此和/或与一个或多个单体 V_H 或 V_L 结构域非共价缔合(例如,通过一个或多个二硫键)。

[0081] 在某些实施方案中,衍生抗原结合片段的抗MAGE-A4抗体是人抗体。如本文所使用的,术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本公开的人抗体可以包括并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中,并且具体地CDR3。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”并非旨在包括以下抗体,在这些抗体中源自另一个哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已经被移植于人类构架区序列上。

[0082] 在各种实施方案中,本公开的抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体(例如,bsAb 6054和/或bsAb 6043)是人抗体。在各种实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体是人IgG抗体。在各种实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体是同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或混合同种型的人抗体。在一些实施方案中,抗MAGE-A4×CD3双特异性抗体是人IgG1抗体(即,该抗体包含分别连接到第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域各自的HCVR的人IgG1重链恒定区)。在一些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体是人IgG4抗体(即,该抗体包含分别连接到第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域各自的HCVR的人IgG4重链恒定区)。在上文或本文所讨论的实施方案中的任一者中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体可包含人 κ 轻链。在上文或本文所讨论的实施方案中的任一者中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体可包含人 λ 轻链。

[0083] 在任何实施方案中,双特异性抗体都可包括一条或两条重链中的修饰以促进从同源二聚体杂质中纯化双特异性抗体(即,异源二聚体)。在一些实施方案中,双特异性抗体包括第一重链和第二重链(即,抗MAGE-A4结合臂的重链和抗CD3结合臂的重链),除了其中一条或另一条重链的CH3结构域中存在减少该双特异性抗体与蛋白A的结合的修饰(与缺乏该修饰的抗体相比)之外,这两条链是相同的(例如,两者均为同种型IgG1或IgG4)。在一些情况下,(例如,抗MAGE-A4结合臂的)第一重链的CH3结构域结合蛋白A,并且(例如,抗CD3结合臂的)第二重链的CH3结构域含有减少或消除蛋白A结合的突变。在一些情况下,突变是H435R修饰(按EU编号;按IMGT外显子编号为H95R)。在一些情况下,突变是H435R修饰(按EU编号;按IMGT外显子编号为H95R)和Y436F修饰(按EU编号;按IMGT编号为Y96F)。可在第二CH3结构域内发现的另外的修饰包括:在IgG1 CH3结构域的情况下,按EU编号的D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I(按IMGT编号的D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I);在IgG4 CH3结构域的情况下,按EU编号的Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I(按IMGT编号的Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I)。

[0084] 在任何实施方案中,双特异性抗体都可包括嵌合铰链。术语“嵌合铰链”意在包括一种嵌合蛋白,其包含源自一种Ig分子的铰链区的第一氨基酸序列和源自不同类别或亚类

Ig分子的铰链区的第二氨基酸序列。例如,在一个实施方案中,嵌合铰链包含源自人IgG1铰链区或人IgG4铰链区的第一氨基酸序列或“上铰链”序列,以及源自人IgG2铰链区的第二氨基酸序列或“下铰链”序列。在某些实施方案中,第一或“上铰链”序列包含根据EU编号的位置216至227的氨基酸残基。在一些实施方案中,第二或“下铰链”序列包含根据EU编号的位置228至236的氨基酸残基。

[0085] 在一些实施方案中,用于产生抗MAGE-A4抗原结合片段和/或嵌合抗原受体的本公开的抗体(其包括双特异性抗体)可以是重组人抗体。如本文所使用的,术语“重组人抗体”旨在包含通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如使用转染到宿主细胞(以下进一步描述)内的重组表达载体表达的抗体、自重组、组合人抗体库(以下进一步描述)中分离的抗体、从对于人类免疫球蛋白基因而言为转基因的动物(例如,小鼠)中分离的抗体(参见例如,Taylor等人,(1992)Nucl.AcidsRes.20:6287-6295),或通过任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体,这些方式涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列上。此类重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,此类重组人抗体经历体外诱变(或,当使用转基因人Ig序列的动物时,经历体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的V_H区和V_L区的氨基酸序列是如下序列:虽然源自人种系V_H序列和V_L序列并与之相关,但可能并非天然体内存在于人抗体种系库中。

[0086] 人抗体可以以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包括约150kDa至160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中,二聚体不通过链间二硫键连接,并且形成约75kDa至80kDa的分子,其由共价偶联的轻链和重链(半抗体)构成。即使在亲和纯化之后,这些形式也极难分离。

[0087] 以各种完整IgG同种型形式出现第二种形式的频率基于但不限于与抗体的铰链区同种型相关的结构差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可将第二种形式的出现(Angal等人,(1993)Molecular Immunology30:105)显著降低到通常使用人IgG1铰链所观察到的水平。本公开涵盖在铰链区、C_H2区或C_H3区中具有一个或多个突变的抗体,其可能是例如,在生产中所期望的,以提升所期望的抗体形式的产量。

[0088] 本文所公开的抗体(其包括双特异性抗体)可以是分离的抗体。如本文所使用的,“分离的抗体”意指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如,已经从生物体的至少一种组分,或从抗体天然存在或天然产生的组织或细胞中分离或除去的抗体是用于本公开的目的的“分离的抗体”。分离的抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经经历至少一个纯化或分离步骤的抗体。因此,分离的抗体还包括基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合人MAGE-A4或人MAGE-A4和人CD3两者的分离的抗体基本上不含特异性结合除人MAGE-A4或人MAGE-A4和人CD3两者以外的抗原的抗体)。然而,如本文所公开的,分离的抗体(如特异性结合人MAGE-A4的分离的抗体)在一些示例中可另外特异性结合一种或多种其他MAGE-A4相关蛋白或肽。根据某些实施方案,分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学品。

[0089] 术语“特异性结合”等意指抗体(其包括双特异性抗体)或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合可以通过至少约 1×10^{-6} M或更大的解离常数表征。用于确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域公知的,并且包括,例如,平衡透析、表面等离子体共振等。然而,特异性结合人MAGE-A4或人MAGE-A4和人CD3两者的分

离的抗体可与其他抗原(如来自其他物种(直系同源物)的MAGE-A4和/或CD3分子)具有交叉反应性。在本发明的上下文中,与人MAGE-A4以及一种或多种其他抗原(包括MAGE-A4相关肽)结合的单特异性抗体被认为“特异性结合”人MAGE-A4。在本发明的上下文中,与人MAGE-A4和人CD3以及一种或多种另外的抗原结合的多特异性(例如,双特异性)抗体被认为“特异性结合”人MAGE-A4和人CD3。

[0090] 可使用标准方法构建包括抗MAGE-A4特异性结合结构域和抗CD3特异性结合结构域的双特异性抗体,其中抗MAGE-A4抗原结合结构域和抗CD3抗原结合结构域各自包含与共同LCVR配对的不同的独特的HCVR。在例示性双特异性抗体中,利用来自抗CD3抗体的重链、来自抗MAGE-A4抗体的重链和来自抗MAGE-A4抗体的共同轻链构筑分子。在其他情况下,可以利用以下构筑双特异性抗体:来自抗CD3抗体的重链、来自抗MAGE-A4抗体的重链和来自抗CD3抗体的轻链,或已知与多种重链臂有效混杂或配对的抗体轻链。

[0091] 根据本发明的某些实施方案,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包含特异性结合人MAGE-A4的第一抗原结合结构域和特异性结合人CD3的第二抗原结合结构域,其中该第一抗原结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:4、6和8的氨基酸序列的重链CDR,即A1-HCDR1、A1-HCDR2和A1-HCDR3,并且该第二抗原结合结构域包括分别包含SEQ ID NO:57或75、59或77和61或79的氨基酸序列的重链CDR,即A2-HCDR1、A2-HCDR2和A2-HCDR3。根据本发明的某些实施方案,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段分别包含共有的(对于第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域两者)轻链互补决定区LCDR1-LCDR2-LCDR3。在一个示例中,共有的轻链互补决定区包含SEQ ID NO:12、14和16的氨基酸序列。在其他示例中,共有的轻链互补决定区包含SEQ ID NO:65、14和67的氨基酸序列。

[0092] 在某些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包含特异性结合人MAGE-A4的第一抗原结合结构域和特异性结合人CD3的第二抗原结合结构域,其中该第一抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:107的氨基酸序列的重链可变区(HCVR),并且该第二抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HCVR。在某些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的共有的轻链可变区(LCVR)。在某些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,该第一抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:2/10的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对,该第二抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:55/10的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:73/10的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在某些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,该第一抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:83/10的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对,该第二抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:55/10的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:73/10的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在某些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,该第一抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:107/115的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对,该第二抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:55/115的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:73/115的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在某些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一抗原结合结构域和第二抗原

结合结构域,该第一抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:2/63的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对,该第二抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:55/63的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:73/63的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在某些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,该第一抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:83/63的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对,该第二抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:55/63的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:73/63的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在某些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,该第一抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:107/63的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对,该第二抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:55/63的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:73/63的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在一些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体包含上述HCVR/LCVR序列对和人IgG1重链恒定区。在一些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体包含上述HCVR/LCVR序列对和人IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体包含上述HCVR/LCVR序列对和人IgG重链恒定区。在一些实施方案中,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体包含上述HCVR/LCVR序列对和人IgG1或IgG4重链恒定区。

[0093] 本文所公开的抗MAGE-A4抗体或其抗原结合片段与衍生抗体的对应种系序列相比可以在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文所公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本公开包括源自本文所公开的任何氨基酸序列的抗体和其抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生抗体的种系序列的一个或多个对应的残基、或突变为另一种人种系序列的一个或多个对应的残基、或突变为一个或多个对应的种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域普通技术人员可以容易地产生包括一个或多个个体种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中, V_H 结构域和/或 V_L 结构域内的框架和/或CDR残基的全部突变回在衍生抗体的原始种系序列中所发现的残基。在其他实施方案中,仅将某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内所发现的突变后的残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变后的残基。在其他实施方案中,一个或多个框架和/或CDR残基中的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生抗体的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应的残基。更进一步,本公开的抗体可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个别残基突变为特定种系序列的对应残基,而与原始种系序列不同的某些其他残基可以维持或突变为不同种系序列的对应残基。一旦获得,可容易地检测含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段的一种或多种所期望的特性,如经改善的结合特异性、增加的结合亲和力、经改善或增强的拮抗或激动的生物学特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。以这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本公开内。

[0094] 抗MAGE-A4抗体可以包括具有一个或多个保守取代的本文所公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一者的变体。例如,抗MAGE-A4抗体可以具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列,相对于本文所阐述的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任何一种,具有例如10

个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少或1个保守氨基酸取代。

[0095] 术语“表位”是指与被称为互补位的抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单一抗原可以具有多于一个表位。因此,不同的抗体可以与抗原上的不同区域结合,并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包括抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0096] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本上相同”表示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一个核酸(或其互补链)进行最佳比对时,核苷酸序列同一性为核苷酸碱基的至少约95%,并且更优选地,至少约96%,97%、98%、99%、99.5%或99.9%,如通过如FASTA、BLAST或Gap等任何众所周知的序列同一性算法所测量的,如以下所讨论的。在某些情况下,具有与参考核酸分子基本同一性的核酸分子可以编码具有与由参考核酸分子编码的多肽相同或基本上类似的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,本公开提供了一种多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:105的序列或与SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:105的一部分至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%相同的序列(例如,HCVR如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:83的序列,或LCVR如SEQ ID NO:10的序列,或多肽序列的框架区如SEQ ID NO:2、10、22或105中所示的那些)。在一些实施方案中,本公开提供了一种编码此类多肽的多核酸。在一些实施方案中,本公开提供了一种多核酸,该多核酸包含与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:104的序列或与SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:104的一部分至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%相同的序列(例如,HCVR如SEQ ID NO:1的序列,或LCVR如SEQ ID NO:9的序列,或多核苷酸序列的框架区如SEQ ID NO:1、9、21或104)。

[0097] 在一些实施方案中,本公开提供了一种多肽,该多肽包含与SEQ ID NO:69的序列或其一部分(如SEQ ID NO:55)或与SEQ ID NO:71的序列或其一部分(如SEQ ID NO:63)或与SEQ ID NO:81的序列或其一部分(如SEQ ID NO:73)至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%相同的序列。在一些实施方案中,本公开提供了一种多核酸,该多核酸包含与SEQ ID NO:68的序列或其一部分(如SEQ ID NO:54)或与SEQ ID NO:70的序列或其一部分(如SEQ ID NO:62)或与SEQ ID NO:80的序列或其一部分(如SEQ ID NO:72)至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少

85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%相同的序列。

[0098] 当应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本上类似”意指当如通过使用默认间隙权重的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,两个肽序列共享至少95%的序列同一性,甚至更优选地,至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有化学特性(例如,电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。总体而言,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守性质。作出此调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如,Pearson, (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331,该文献以引用方式并入本文。具有相似化学特性的侧链的氨基酸的组的示例包括(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,并且(7)含硫侧链是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是公开于以下文献的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化:Gonnet等人, (1992) *Science* 256:1443-1445,该文献以引用方式并入本文。“适度保守”替代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0099] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性,也被称为序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸取代)的类似性的度量来匹配类似的序列。例如,GCG软件含有如Gap和Bestfit等程序,这些程序可以与默认参数一起使用,以确定紧密相关的多肽,如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,6.1版GCG。还可以使用使用默认或推荐的参数的FASTA来比较多肽序列,所述FASTA为6.1版GCG中的程序。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供了询问序列与搜索序列之间的最佳重叠区域的对齐和序列同一性百分比(Pearson (2000),同上文)。序列也可以使用Smith-Waterman同源性搜索算法进行比较,该算法使用的仿射缺口搜索的缺口开放罚分为12,并且缺口延伸罚分为2,BLOSUM矩阵为62。当比较本公开的序列与含有大量来自不同生物的序列的数据库时,另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如,Altschul等人, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410以及Altschul等人, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402,这些文献各自以引用方式并入本文。

[0100] 如本文所使用的,术语“核酸”或“多核苷酸”是指核苷酸和/或多核苷酸,如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、通过聚合酶链反应(PCR)生成的片段,以及通过连接、断裂、核酸内切酶作用和核酸外切酶作用中的任何一者生成的片段。核酸分子可以由天然存在的核苷酸(如DNA和RNA)的单体或天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的对映异构形式)或两者的组合构成。经修饰的核苷酸可以在糖部分中和/或在嘧啶或嘌呤碱基部分中具有改变。糖修饰包括例如用卤素、烷基、胺和叠氮基置换一个或多个

羟基,或者糖可以被官能化为醚或酯。此外,整个糖部分可以被空间和电子类似的结构(如氮杂糖和碳环糖类似物)置换。碱基部分中的修饰的示例包括烷基化的嘌呤和嘧啶、酰化的嘌呤或嘧啶或其他众所周知的杂环取代基。核酸单体可以通过磷酸二酯键或此类连接的类似物连接。核酸可以是单链或双链的。

[0101] 术语“嵌合抗原受体”(CAR)是指将针对靶细胞上存在的组分的结合结构域(例如,对期望的抗原(例如,肿瘤抗原如MAGE-A4)的基于抗体的特异性)与T细胞受体活化的细胞内结构域组合以生成展现出特异性抗靶细胞免疫活性的嵌合蛋白的分子。通常,CAR由与T细胞抗原受体复合物 ζ 链的细胞内信号传导结构域融合的细胞外单链抗体结合结构域(scFv)组成,并且在T细胞中表达时,具有基于单克隆抗体的特异性重定向抗原识别的能力。

[0102] 术语“HLA”是指人白细胞抗原(HLA)系统或复合物,其是编码人的主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的基因复合物。这些细胞表面蛋白负责调节人的免疫系统。对应于I类MHC(A、B和C)的HLA从细胞内部呈递肽。在本申请的上下文中,如果肽与HLA系统或复合物结合,则该肽可以是“HLA结合的”。在一些实施方案中,HLA结合的肽存在于细胞的表面上。

[0103] 术语“HLA-A”是指由HLA-A基因座编码的人白细胞抗原(HLA)的组。HLA-A是I类人MHC细胞表面受体的三种主要类型之一。受体是异二聚体,并且由重 α 链和较小 β 链构成。 α 链由变体HLA-A基因编码,并且 β 链(β 2-微球蛋白)是不变的 β 2微球蛋白分子。

[0104] 术语“HLA-A2”是HLA-A基因座处的一个特定的I类主要组织相容性复合物(MHC)等位基因组; α 链由HLA-A*02基因编码,并且 β 链由 β 2-微球蛋白或B2M基因座编码。

[0105] 如本文所使用的,术语“载体”包括但不限于病毒载体、质粒、RNA载体或线性或环状DNA或RNA分子,其可以由染色体、非染色体、半合成或合成核酸组成。在一些情况下,载体是能够自主复制(游离型载体)和/或表达与其连接的核酸(表达载体)的那些。大量合适的载体是本领域的技术人员已知的,并且可商购获得。病毒载体包括逆转录病毒,腺病毒,细小病毒(例如,腺伴随病毒)、冠状病毒、如正粘病毒(例如,流感病毒)等负链RNA病毒、弹状病毒(例如,狂犬病和水泡性口炎病毒)、副粘病毒(例如,麻疹和仙台)、如小核糖核酸病毒和甲病毒等正链RNA病毒以及双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(例如,单纯性疱疹病毒1型和2型、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、巨细胞病毒)和痘病毒(例如,牛痘、鸡痘和金丝雀痘)。其他病毒包括例如诺沃克病毒(Norwalk virus)、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝dna病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的示例包括:禽白血病肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组和慢病毒。

[0106] “共刺激结构域”或“共刺激分子”是指T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性结合,从而介导细胞的共刺激应答,诸如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和To11配体受体。共刺激分子的示例包括CD27、CD28、CD8、4-1BB(CD137)(SEQ ID NO:29)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3以及与CD83特异性结合的配体等。共刺激分子是除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子,该共刺激分子是有效免疫应答所必需的。

[0107] “共刺激配体”是指抗原呈递细胞上的一种分子,该分子特异性结合T细胞上的同源共刺激分子,从而提供了除了由例如TCR/CD3复合物与负载有肽的MHC分子的结合所提供的初级信号外的信号,该信号介导T细胞应答,包括但不限于增殖活化、分化等。共刺激配体

可包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体 (ICOS-L)、细胞间粘附分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/TR6、ILT3、ILT4、结合To11配体受体的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。

[0108] “共刺激信号”是指与初级信号 (如TCR/CD3连接) 组合导致T细胞增殖和/或关键分子上调或下调的信号。

[0109] 如本文所使用的,术语“细胞外配体结合结构域”是指能够结合配体例如细胞表面分子的寡肽或多肽。例如,可以选择细胞外配体结合结构域以识别充当与特定疾病状态 (例如,癌症) 相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体。可以作为配体的细胞表面标志物的示例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌细胞相关的那些。细胞外配体结合结构域可包含任选地通过接头连接的LCVR区和HCVR区 (例如,格式化为scFv)。

[0110] 如本文所使用的,术语“受试者”或“患者”包括动物界的所有成员,包括非人灵长类动物和人类。在一个实施方案中,患者是患有癌症 (例如多发性骨髓瘤或黑素瘤) 的人。

[0111] 如本文所使用的,CAR的“信号转导结构域”或“信号传导结构域”负责细胞外配体结合结构域与靶标结合后的细胞内信号传导,从而活化免疫细胞和免疫应答。换言之,信号转导结构域负责活化表达CAR的免疫细胞的正常效应子功能中的至少一种正常效应子功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性 (包括细胞因子的分泌)。因此,术语“信号传导结构域”指代蛋白质的一部分,这一部分转导效应子功能信号并引导细胞执行专门功能。供CAR中使用的信号转导结构域的示例可以是T细胞受体和共同受体的在抗原受体结合后协同作用以启动信号转导的细胞质序列以及这些序列的任何衍生物或变体以及具有同一功能能力的任何合成序列。在一些情况下,细胞内信号传导结构域包括两种不同类型的细胞质信号传导序列:启动抗原依赖性初级激活的细胞质信号传导序列,以及以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的细胞质信号传导序列。初级细胞质信号传导序列可包括被称为ITAM的基于免疫受体酪氨酸的活化基序的信号传导基序。ITAM是在用作syk/zap70类酪氨酸激酶的结合位点的多种受体的细胞质内尾部中发现的明确定义的信号传导基序。示例性ITAM包括源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一些实施方案中,CAR的信号转导结构域可以包括CD3 ζ 信号传导结构域 (SEQ ID NO:30)。

[0112] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0113] 嵌合抗原受体 (CAR) 可以将T细胞特异性重定向到细胞 (例如,癌细胞) 表面上抗体识别的抗原,无论那些抗原是在细胞表面上表达还是在细胞内表达并且由例如HLA呈递。

[0114] 本公开的一个方面包括嵌合抗原受体 (CAR),其对如肿瘤细胞等细胞的表面上呈递的MAGE-A4抗原具有特异性。例如,此呈递可以通过例如如HLA-A2等HLA进行。在本公开的一个实施方案中,如本文所描述的CAR包括细胞外靶标特异性结合结构域、跨膜结构域、细胞内信号传导结构域 (如源自CD3 ζ 或FcR γ 的信号传导结构域) 和/或一种或多种源自共刺激分子的共刺激信号传导结构域,如但不限于4-1BB。在一个实施方案中,CAR包括细胞外结合结构域与跨膜结构域之间的铰链或间隔区如CD8 α 铰链。

[0115] CAR的结合结构域或细胞外结构域为CAR提供了与所关注的靶抗原结合的能力。结合结构域 (例如,配体结合结构域或抗原结合结构域) 可以是具有特异性识别和结合生物分

子(例如,细胞表面受体或肿瘤蛋白或其组分)的能力的任何蛋白质、多肽、寡肽或肽。结合结构域包括兴趣生物分子的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。例如,并且如本文进一步描述的,结合结构域可以是抗体轻链和重链可变区,或者轻链和重链可变区可以以单链和任一朝向连接在一起(例如,VL-VH或VH-VL)。用于鉴定与特定靶标特异性结合的本公开的结合结构域的多种测定是已知的,包括蛋白质印迹、ELISA、流式细胞术或表面等离子共振分析(例如,使用BIAcore分析)。靶标可以是临床所关注的抗原,期望针对所述抗原触发导致肿瘤杀伤的效应免疫应答。在一个实施方案中,嵌合抗原受体的结合结构域的靶抗原是肿瘤细胞表面上的MAGE-A4蛋白(例如,如HLA-A2呈递的MAGE-A4蛋白等HLA呈递的MAGE-A4蛋白)。

[0116] 说明性配体结合结构域包括抗原结合蛋白(如抗体的抗原结合片段(如scFv))、scTCR、受体的细胞外结构域、细胞表面分子/受体的配体或其受体结合结构域,以及肿瘤结合蛋白。在某些实施方案中,包括在本公开的CAR中的抗原结合结构域可以是可变区(Fv)、CDR、Fab、scFv、VH、VL、结构域抗体变体(dAb)、骆驼抗体(VHH)、纤连蛋白3结构域变体、锚蛋白重复变体和其他源自其他蛋白质支架的抗原特异性结合结构域。

[0117] 在一个实施方案中,CAR的结合结构域是抗MAGE-A4单链抗体(scFv),并且可以是鼠、人或人源化scFv。单链抗体可以克隆自针对期望靶标具有特异性的杂交瘤的V区基因。可以用于克隆可变区重链(VH)和可变区轻链(VL)的技术已经描述于例如Orlandi等人,PNAS,1989;86:3833-3837。因此,在某些实施方案中,结合结构域包括抗体衍生的结合结构域但可以是非抗体衍生的结合结构域。抗体衍生的结合结构域可以是抗体的片段或抗体的一个或多个片段的经基因工程化的产物,所述片段涉及与抗原的结合。

[0118] 在某些实施方案中,本公开的CAR可包括不同结构域之间的为了分子的适当间隔和构象而添加的接头。例如,在一个实施方案中,结合结构域VH或VL之间可以有接头,该接头的长度可以在1与20个氨基酸之间。在其他实施方案中,嵌合抗原受体的结构域中的任何结构域之间的接头的长度可以在1与15个氨基酸之间或为15个氨基酸。在这点上,接头的长度可以为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸。在另外的实施方案中,接头的长度可以为21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个氨基酸。包括本文所描述的数字的范围也包括在本文中,例如10个到30个氨基酸长的接头。

[0119] 在某些实施方案中,适用于本文所描述的CAR的接头是柔性接头。合适的接头可以容易地选择,并且可以具有任何合适的不同长度,如1个氨基酸(例如,Gly)到20个氨基酸、2个氨基酸到15个氨基酸、3个氨基酸到12个氨基酸,包括4个氨基酸到10个氨基酸、5个氨基酸到9个氨基酸、6个氨基酸到8个氨基酸或7个氨基酸到8个氨基酸,并且可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个或7个氨基酸。

[0120] 示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物相对较非结构化,因此可以能够充当如本文所描述的CAR等融合蛋白的结构域之间的中性系链。甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基受到的限制要少得多(参见Scheraga, Rev.ComputationalChem.11173-142(1992))。普通技术人员将认识到,CAR的设计可以包括

完全或部分柔性的接头,使得接头可以包括柔性接头以及赋予较少的柔性结构的一个或多个部分以提供期望的CAR结构。具体接头包括(G4S)_n接头,其中n=1-3,如SEQ ID NO:23-25所示。另一个示例性接头作为SEQ ID NO:26提供。接头可以存在于CAR的LCVR区与HCVR区之间、可变区(如HCVR)与铰链区(如CD8 α 铰链)之间或者两者之间。例如,本公开提供了一种CAR,其包括LCVR与HCVR之间的(G4S)₃接头以及HCVR与CD8 α 铰链之间的(G4S)₁接头。

[0121] CAR的结合结构域之后可以是“间隔区”或“铰链”,该“间隔区”或“铰链”是指使抗原结合结构域移动远离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化的区域(Patel等人, Gene Therapy, 1999;6:412-419)。CAR中的铰链区通常位于跨膜(TM)与结合结构域之间。在某些实施方案中,铰链区是免疫球蛋白铰链区,并且可以是野生型免疫球蛋白铰链区或改变的野生型免疫球蛋白铰链区。本文所描述的CAR中使用的其他示例性铰链区包括源自如CD8 α 、CD4、CD28和CD7等1型膜蛋白的细胞外区的铰链区,它们可以是来自这些分子的野生型铰链区或可以被改变。在一个实施方案中,铰链区包括CD8 α 铰链(SEQ ID NO:27)。

[0122] “跨膜”区或结构域是将细胞外结合部分锚定在免疫效应细胞的质膜上并促进结合结构域与靶抗原结合的CAR的一部分。跨膜结构域可以是CD3 ζ 跨膜结构域,但是可以采用的其他跨膜结构域包括从CD8 α 、CD4、CD28、CD45、CD9、CD16、CD22、CD33、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154获得的那些。在一个实施方案中,跨膜结构域是CD137的跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在某些实施方案中,跨膜结构域是合成的,在这种情况下跨膜结构域将主要包括如亮氨酸和缬氨酸等疏水性残基。

[0123] “细胞内信号传导结构域”或“信号传导结构域”是指嵌合抗原受体蛋白的一部分,该部分参与将有效CAR结合靶抗原的信息转导到免疫效应细胞内部以引发效应细胞功能,例如活化、细胞因子产生、增殖和细胞毒性活性,包括细胞毒性因子向CAR结合的靶细胞的释放或者由抗原结合到细胞外CAR结构域引发的其他细胞应答。术语“效应子功能”是指细胞的专门功能。T细胞的效应子功能例如可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,在本文中可互换使用的术语“细胞内信号传导结构域”或“信号传导结构域”是指蛋白质的一部分,这一部分转导效应子功能信号并且引导细胞执行专门功能。虽然通常可以采用整个细胞内信号传导结构域,但在许多情况下不必使用整个结构域。在使用细胞内信号传导结构域的截短部分的程度上,可以使用这种截短部分代替整个结构域,只要其转导效应子功能信号即可。术语细胞内信号传导结构域意在包括细胞内信号传导结构域的足以转导效应子功能信号的任何截短部分。细胞内信号传导结构域也称为“信号转导结构域”,并且通常源自人CD3或FcR γ 链的部分。

[0124] 已知的是,仅通过T细胞受体生成的信号不足以完全活化T细胞,并且还需要次级信号或共刺激信号。因此,T细胞活化可以说成是由两种不同类别的细胞质信号传导序列介导的:通过T细胞受体启动抗原依赖性初级活化的那些(初级细胞质信号传导序列)和以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级细胞质信号传导序列)。以共刺激方式起作用的细胞质信号传导序列可以含有被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。

[0125] 在本公开中具有特定用途的含有ITAM的初级细胞质信号传导序列的示例包括源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一个特

定的实施方案中,本文所描述的抗MAGE-A4 CAR的细胞内信号传导结构域源自CD3 ζ 。在一些实施方案中,信号传导结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0126] 如本文所使用的,术语“共刺激信号传导结构域”或“共刺激结构域”是指包含共刺激分子的细胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体之外的细胞表面分子,这些共刺激分子提供在与抗原结合后有效活化和T淋巴细胞功能所需的第二信号。此类共刺激分子的示例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS (CD278)、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2和特异性结合CD83的配体。因此,虽然本公开提供了源自CD3 ζ 和4-1BB的示例性共刺激结构域,但考虑其他共刺激结构域与本文所描述的CAR一起使用。包含一个或多个共刺激信号传导结构域可以增强表达CAR受体的T细胞的功效和扩增。细胞内信号传导结构域和共刺激信号传导结构域可以按任何顺序与跨膜结构域的羧基端串联连接。在一些实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0127] 尽管被工程化为含有来自CD3或FcR γ 的信号传导结构域的基于scFv的CAR已被证明为T细胞活化和效应子功能递送有效信号,但它们在不存在伴随共刺激信号的情况下,不足以引发促进T细胞存活和扩增的信号。含有结合结构域、铰链、跨膜和源自CD3 ζ 或FcR γ 的信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号传导结构域(例如,源自CD28、CD137、CD134和CD278的细胞内共刺激结构域)的其他CAR可以在体外以及动物模型和癌症患者中更有效地引导抗肿瘤活性以及增加表达CAR的T细胞的细胞因子分泌、裂解活性、存活和增殖(Milone等人,Molecular Therapy,2009;17:1453-1464;Zhong等人,Molecular Therapy,2010;18:413-420;Carpenito等人,PNAS,2009;106:3360-3365)。

[0128] 在各种实施方案中,本公开的抗MAGE-A4 CAR包括:(a)作为结合结构域的抗MAGE-A4 scFv(例如,具有来自表1中鉴定的抗MAGE-A4抗体的结合区(例如,CDR或可变域)的scFv);(b)源自人CD8 α 的铰链区;(c)人CD8 α 跨膜结构域;和(d)人T细胞受体CD3 ζ 链(CD3)细胞内信号传导结构域,以及任选的一个或多个共刺激信号传导结构域例如4-1BB。在一个实施方案中,不同的蛋白质结构域按照以下顺序从氨基端到羧基端布置:结合结构域、铰链区和跨膜结构域。细胞内信号传导结构域和任选的共刺激信号传导结构域以任何顺序串联连接到跨膜羧基端以形成单链嵌合多肽。在一个实施方案中,编码抗MAGE-A4 CAR的核酸构建体是包括核酸分子的嵌合核酸分子,所述核酸分子包括不同的编码序列,例如(5'到3')人抗MAGE-A4 scFv、人CD8 α 铰链、人CD8 α 跨膜结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域的编码序列。在另一个实施方案中,编码抗MAGE-A4 CAR的核酸构建体是包括核酸分子的嵌合核酸分子,所述核酸分子包括不同的编码序列,例如(5'到3')人抗MAGE-A4 scFv、人CD8 α 铰链、人CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 共刺激结构域的编码序列。

[0129] 在某些实施方案中,将编码本文所描述的CAR的多核苷酸插入到载体中。载体是可以将编码蛋白质的多核苷酸共价插入其中以便引起该蛋白质的表达和/或多核苷酸的克隆的媒介。此类载体也可以被称为“表达载体”。可以使用本领域已知的任何合适方法将分离的多核苷酸插入载体中,例如但不限于,可以使用适当的限制酶消化载体,并且然后可以将其与具有匹配的限制性末端的分离的多核苷酸连接。表达载体可以具有掺入并表达编码能够在细胞中转录的基因产物的至少一部分的异源或经修饰的核酸序列的能力。在大多数情况下,RNA分子然后被翻译成蛋白质。表达载体可以含有多种控制序列,其是指特定宿主生

物体中的可操作连接的编码序列的转录和可能翻译所必需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列外,载体和表达载体还可以含有具有其他功能的核酸序列,并且在下文中进行讨论。表达载体可以包括另外的元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,从而使其在两种生物体中维持,例如在人类细胞中进行表达并在原核宿主中进行克隆和扩增。

[0130] 表达载体可以具有必需的5'上游和3'下游调节元件,如启动子序列(如CMV、PGK和EF1 α 启动子)、核糖体识别和结合TATA盒以及3'UTRAAUA AAA转录终止序列,以用于在其相应的宿主细胞中进行高效的基因转录和翻译。其他合适的启动子包括猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、HIV LTR启动子,MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、EBV立即早期启动子和劳斯肉瘤病毒启动子的组成型启动子。也可以使用人基因启动子,包括但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。在某些实施方案中,诱导型启动子也被认为是表达嵌合抗原受体的载体的一部分。这提供了能够开启所关注的多核苷酸序列的表达或关闭表达的分子开关。诱导型启动子的示例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子或四环素启动子。

[0131] 表达载体可以具有另外的序列,如并入到表达的CAR中的6x组氨酸、c-Myc和FLAG标签。因此,表达载体可以被工程化以含有5'和3'未翻译调节序列,这些序列有时可以充当可以促进或增强表达载体上携带的所关注的一个或多个核酸的高效转录的增强子序列、启动子区和/或终止子序列。表达载体也可以被工程化用于在特定细胞类型、细胞位置或组织类型中的复制和/或表达功能(例如,转录和翻译)。表达载体可以包括用于在宿主或受体细胞中维持载体的可选择标志物。

[0132] 在各种实施方案中,载体是质粒、自主复制序列和转座元件。另外的示例性载体包括但不限于:质粒、噬菌粒、粘粒、人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)、如 λ 噬菌体或M13噬菌体等噬菌体以及动物病毒。可用作载体的动物病毒的分类的示例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如,单纯性疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒(例如,SV40)。表达载体的示例是:用于在哺乳动物细胞中表达的Lenti-X™双顺反子表达系统(Neo)载体(Clontech)和pClneo载体(Promega);用于哺乳动物细胞中的慢病毒介导的基因转移和表达的pLenti4/V5-DEST.TM.、pLenti6/V5-DEST.TM.和pLenti6.2N5-GW/lacZ(Invitrogen)。可以将本文公开的CAR的编码序列连接到此类表达载体中,以在哺乳动物细胞中表达嵌合蛋白。

[0133] 在某些实施方案中,在病毒载体中提供了编码本公开的CAR的核酸。病毒载体可以是源自逆转录病毒、慢病毒或泡沫病毒的那些病毒载体。如本文所使用的,术语“病毒载体”是指核酸载体构建体,其包括至少一种病毒来源的元件并且具有被包装到病毒载体颗粒中的能力。病毒载体可以含有代替非必需病毒基因的本文所描述的各种嵌合蛋白质的编码序列。载体和/或颗粒可以用于在体外或体内将DNA、RNA或其他核酸转移到细胞中的目的。多种形式的病毒载体是本领域已知的。

[0134] 在某些实施方案中,含有本文所描述的CAR的编码序列的病毒载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体。术语“逆转录病毒载体”是指含有主要源自逆转录病毒的结构和功能遗传元件的载体。术语“慢病毒载体”是指LTR外部的含有主要源自慢病毒的结构和功能遗传元件的载体。

[0135] 供本文使用的逆转录病毒载体可以源自任何已知的逆转录病毒(例如,c型逆转录病毒,如莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗兰德病毒(Friend)、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV))。本公开的“逆转录病毒”还包括人T细胞白血病病毒、HTLV-1和HTLV-2以及逆转录病毒的慢病毒家族,如人免疫缺陷病毒、HIV-1、HIV-2、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、马免疫缺陷病毒(EIV)和其他类别的逆转录病毒。

[0136] 供本文使用的慢病毒载体是指源自慢病毒(引起缓慢发展的疾病的逆转录病毒组(或属))的载体。包括在该组内的病毒包括:HIV(人类免疫缺陷病毒;包括HIV 1型和HIV 2型);维斯纳-梅迪病毒;山羊关节炎脑炎病毒;马传染性贫血病毒;猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);和猴免疫缺陷病毒(SIV)。重组慢病毒的制备可以使用根据Dull等人(Dull等人,J.Virol,1998,72:8463-8471和Zufferey等人,J.Virol,1998,72:9873-9880)的方法来实现。

[0137] 用于本公开的逆转录病毒(即,慢病毒和非慢病毒两者)载体可使用标准克隆技术通过以本文所描述的顺序和方向组合期望的DNA序列来形成(Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel,F.M.等人(编辑),Greene Publishing Associates(1989),第9.10-9.14节和其他标准实验室手册;Eglitis等人,(1985) Science,230:1395-1398; Danos和Mulligan,(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:6460-6464;Wilson等人,(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:3014-3018;Armentano等人,(1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6141-6145;Huber等人,(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:8039-8043;Ferry等人,(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:8377-8381;Chowdhury等人,(1991), Science,254:1802-1805;van Beusechem等人,(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:7640-7644;Kay等人,(1992) Human GeneTherapy,3:641-647;Dai等人,(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:10892-10895;Hwu等人,(1993) J.Immunol,150:4104-4115;美国专利第4,868,116号;美国专利第4,980,286号;PCT申请WO 89/07136;PCT申请WO 89/02468;PCT申请WO 89/05345;以及PCT申请WO 92/07573)。

[0138] 用于获得用于形成载体的逆转录病毒(即慢病毒和非慢病毒两者)序列的合适来源包括例如可从可商购来源(包括美国马里兰州罗克维尔的典型培养物保藏中心(ATCC))获得的基因组RNA和cDNA。序列也可以化学合成。

[0139] 为了表达抗MAGE-A4 CAR,可以将载体引入到宿主细胞中以允许多肽在宿主细胞内表达。表达载体可以含有用于控制表达的各种元件,包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、可选择标志物和信号序列。如本文所描述的,这些元件可以由本领域普通技术人员适当地选择。例如,可以选择启动子序列以促进载体中多核苷酸的转录。合适的启动子序列包括但不限于T7启动子、T3启动子、SP6启动子、 β -肌动蛋白启动子、EF1a启动子、CMV启动子和SV40启动子。可以选择增强子序列以增强多核苷酸的转录。可以选择可选择标志物以允许从没有插入载体的宿主细胞中选择宿主细胞来插入载体,例如,可选择标志物可以是赋予抗生素抗性的基因。可以选择信号序列以允许经表达的多肽被转运到宿主细胞之外。

[0140] 为了克隆多核苷酸,可以将载体引入到宿主细胞(分离的宿主细胞)中以允许载体

自身复制,从而扩增其中所包含的多核苷酸的拷贝。克隆载体可以含有序列组分,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、增强子序列和可选择标志物。这些元件可以由本领域普通技术人员适当地选择。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。

[0141] 在某些实施方案中,本公开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所含有的多核苷酸。合适的宿主细胞可以包括但不限于原核细胞、真菌细胞、酵母细胞或更高等的真核细胞,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,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如埃希氏杆菌属(*Escherichia*) (例如,大肠杆菌(*E. coli*))、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*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,粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)) and 志贺氏菌属(*Shigella*);以及杆菌属(*Bacilli*),如枯草杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*),如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。

[0142] 可使用本领域已知的转染和/或转导技术将本公开的CAR引入到宿主细胞中。如本文所使用的,术语“转染”和“转导”是指将外源性核酸序列引入到宿主细胞中的过程。核酸可以整合到宿主细胞DNA中或可以在染色体外维持。核酸可以瞬时维持或可以是稳定的引入。转染可以通过本领域已知的各种方法来完成,包括但不限于磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂质转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和基因枪法。转导是指使用病毒或逆转录病毒载体通过病毒感染而不是通过转染来递送一个或多个基因。在某些实施方案中,逆转录病毒载体是通过在与细胞接触之前将载体包装到病毒体中来转导的。例如,逆转录病毒载体携带的编码抗MAGE-A4 CAR的核酸可以通过感染和前病毒整合被转导到细胞中。

[0143] 如本文所使用的,术语“经基因工程化的”或“经基因修饰的”是指将DNA或RNA形式的额外的遗传物质添加到细胞中的总遗传物质中。术语“经基因修饰的细胞”、“经修饰的细胞”和“重定向细胞”可互换使用。

[0144] 具体地,本公开的CAR被引入到免疫效应细胞中并表达,以便将它们特异性重定向到所关注的靶抗原,例如恶性的表达MAGE-A4的细胞,如呈递MAGE-A4与HLA-A2的恶性细胞。

[0145] 本公开提供了用于制作表达如本文所描述的CAR的免疫效应细胞的方法。在一个实施方案中,该方法包括转染或转导从如具有表达MAGE-A4的肿瘤细胞的受试者等受试者分离的免疫效应细胞,使得免疫效应细胞表达一种或多种如本文所描述的CAR。在某些实施方案中,免疫效应细胞从个体分离并经基因修饰而无需在体外进一步操纵。然后,可以将这种细胞直接再次施用到个体。在另外的实施方案中,免疫效应细胞在经基因修饰以表达CAR之前首先在体外被活化和刺激以增殖。在这方面,免疫效应细胞可以在经基因修饰(即,如本文所描述被转导或转染以表达CAR)之前或之后培养。

[0146] 在本文所描述的免疫效应细胞的体外操纵或基因修饰之前,可以从受试者获得细胞来源。具体地,与本文所描述的CAR一起使用的免疫效应细胞包括T细胞。可以从多个来源

获得T细胞,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在某些实施方案中,可以使用技术人员已知的任何数量的技术(如FICOLL分离)从收集自受试者的单位血液中获得T细胞。在一个实施方案中,通过单采血液成分术获得来自个体的循环血液的细胞。单采血液成分术产品通常含有淋巴细胞,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。在一个实施方案中,可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以除去血浆部分并且将细胞置于合适的缓冲液或培养基中用于后续处理。在本公开的一个实施方案中,用PBS洗涤细胞。在替代性实施方案中,洗涤溶液缺乏钙,并且可能缺乏镁,或者可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。如本领域普通技术人员应了解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来完成,如通过使用半自动流通离心机。洗涤后,可以将细胞重悬浮于各种生物相容性缓冲液或其他有或没有缓冲液的盐水溶液中。在某些实施方案中,可以在细胞直接重悬的培养基中除去不期望的单采血液成分样品的组分。

[0147] 在某些实施方案中,通过裂解红细胞并且消耗单核细胞(例如,通过用PERCOLL™梯度离心)从外周血单核细胞(PBMC)中分离T细胞。可以通过阳性选择技术或阴性选择技术进一步分离特定的T细胞亚群,如CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+和CD45RO+T细胞。例如,可以通过针对阴性选择的细胞特有的表面标志物的抗体的组合来完成通过阴性选择富集T细胞群。供本文使用的一种方法是通过使用单克隆抗体的混合物的负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或细胞选择,这些单克隆抗体针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标志物。例如,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。流式细胞术和细胞分选也可以用于分离所关注的细胞群以供本公开中使用。

[0148] 通过使用如本文所描述的方法,PBMC可以直接用于通过CAR进行的基因修饰。在某些实施方案中,在PBMC的分离之后,进一步分离T淋巴细胞,并且在某些实施方案中,可以在基因修饰和/或扩增之前或之后将细胞毒性和辅助性T淋巴细胞分类为原初、记忆和效应T细胞亚群。CD8+细胞可以通过使用标准方法获得。在一些实施方案中,通过鉴定与那些类型的CD8+细胞中的每一种相关的细胞表面抗原,CD8+细胞进一步分选为原初中枢记忆细胞和效应细胞。在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8+外周血淋巴细胞的CD62L+和CD62L-亚组中。PBMC在用抗CD8和抗CD62L抗体染色后分选为CD62L-CD8+和CD62L+CD8+部分。在一些实施方案中,中枢记忆TCM的表型标志物的表达包括CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和CD127,并且对颗粒酶B呈阴性。在一些实施方案中,中枢记忆T细胞是CD45RO+、CD62L+、CD8+T细胞。在一些实施方案中,效应T细胞对CD62L、CCR7、CD28和CD127呈阴性,并且对颗粒酶B和穿孔素呈阳性。在一些实施方案中,原初CD8+T淋巴细胞的特征在于包括CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD 127和CD45RA的原初T细胞表型标志物的表达。

[0149] 在某些实施方案中,CD4+T细胞被进一步分选为亚群。例如,通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,CD4+T辅助性细胞可以分选为原初中枢记忆细胞和效应细胞。CD4+淋巴细胞可以通过标准方法获得。在一些实施方案中,原初CD4+T淋巴细胞是CD45RO-、CD45RA+、CD62L+CD4+T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞是CD62L阳性和CD45RO阳性的。在一些实施方案中,效应CD4+细胞是CD62L和CD45RO阴性的。

[0150] 可以在分离之后使用已知方法对免疫效应细胞如T细胞进行基因修饰,或者可以

在进行基因修饰之前对免疫效应细胞进行体外活化和扩增(或在祖细胞的情况下分化)。在另一个实施方案中,将如T细胞等免疫效应细胞用本文所描述的嵌合抗原受体进行基因修饰(例如,用包括编码CAR的核酸的病毒载体进行转导)并且然后在体外活化和扩增。用于活化和扩增T细胞的方法在本领域中是已知的并且在例如美国专利第6,905,874号;美国专利第6,867,041号;美国专利第6,797,514号;WO2012079000描述。通常,此类方法包括在具有如IL-2等适当细胞因子的培养基中,使PBMC或分离的T细胞与通常连接到珠粒或其他表面的刺激剂和共刺激剂如抗CD3和抗CD28抗体接触。连接到同一珠粒的抗CD3和抗CD28抗体充当“取代”抗原呈递细胞(APC)。在其他实施方案中,可以使用如以下中描述的那些等方法来活化和刺激T细胞以与饲养细胞和适当的抗体和细胞因子一起增殖:美国专利第6,040,177号;美国专利第5,827,642号;和WO2012129514。

[0151] 本公开提供了一种经修饰的免疫效应细胞群,其用于治疗具有由表达MAGE-A4的肿瘤(例如,多发性骨髓瘤或黑素瘤)引起的恶性肿瘤的患者,所述经修饰的免疫效应细胞包含如本文所公开的抗MAGE-A4 CAR。

[0152] 如本文所描述制备的表达CAR的免疫效应细胞可以用于根据已知技术的过继免疫疗法的方法和组合物,或基于本公开对本领域技术人员显而易见的其变体。参见例如, Gruenberg等人的美国专利申请公开第2003/0170238号;还可参见Rosenberg的美国专利第4,690,915号。

[0153] 在一些实施方案中,通过首先从细胞的培养基中采集细胞,然后在适于以治疗有效量施用的介质和容器系统(“药学上可接受的”载体)中洗涤和浓缩细胞来配制细胞。合适的输注介质可以是任何等渗介质制剂,通常是生理盐水, Normosol R(雅培公司(Abbott))或血浆-裂解物A(百特公司(Baxter)),但是也可以使用溶解于水或乳酸林格氏液的5%葡萄糖。输注介质可以用人血清白蛋白补充。

[0154] 组合物中细胞的治疗有效量为至少2个细胞(例如,至少1个CD8+中枢记忆T细胞和至少1个CD4+辅助性T细胞亚组)或更典型地多于 10^2 个细胞,至多可达 10^6 个细胞,包括 10^8 个或 10^9 个细胞,并且可以多于 10^{10} 个细胞。细胞的数目将取决于组合物的期望最终用途,其中包括的细胞的类型也是如此。

[0155] 这些细胞对于接受疗法的患者可以是自体的或异源的。如果需要,治疗还可以包括施用如本文所描述的有丝分裂原(例如,PHA)或淋巴因子、细胞因子和/或趋化因子(例如,IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18和TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α 等)以增强免疫应答的诱导。

[0156] 本公开的表达CAR的免疫效应细胞群可以单独施用,或者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施用。简而言之,本公开的药物组合物可包含如本文所描述的表达CAR的免疫效应细胞群(如T细胞),以及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。此类组合物可包含:缓冲剂,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;助剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。本公开的组合物优选地被配制用于静脉内施用。

[0157] 通过使用本文所描述的方法或本领域已知的其他方法施用本文所描述的表达CAR的T细胞在受试者中诱导的抗肿瘤免疫应答可包括由能够杀伤感染细胞的细胞毒性T细胞、

调节性T细胞和辅助性T细胞应答介导的细胞免疫应答。还可以诱导主要由能够活化B细胞从而导致抗体产生的辅助性T细胞介导的体液免疫应答。可以使用多种技术来分析由本公开的组合物诱导的免疫应答的类型,这些技术在本领域中有充分描述;例如,John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober编辑的Current Protocols in Immunology(2001),John Wiley&Sons, NY, N.Y.。

[0158] 因此,本公开提供了一种治疗被诊断患有或怀疑患有或有风险患上恶性肿瘤的个体的方法,该恶性肿瘤至少部分以癌细胞(例如,表达MAGE-A4的实体瘤细胞)表达MAGE-A4为特征,该方法包括向该个体施用治疗有效量的如本文所描述的表达CAR的免疫效应细胞。

[0159] 在一个实施方案中,本公开提供了一种治疗被诊断患有表达MAGE-A4的癌症的受试者的方法,该方法包括从被诊断患有表达MAGE-A4的癌症的受试者中去除免疫效应细胞,用包含编码本公开的嵌合抗原受体的核酸的载体对所述免疫效应细胞进行基因修饰从而产生经修饰的免疫效应细胞群,以及将所述经修饰的免疫效应细胞群施用于同一受试者。在一个实施方案中,免疫效应细胞包括T细胞。

[0160] 用于施用本文所描述的细胞组合物的方法包括任何有效导致重新引入在受试者中直接表达本公开的CAR的经离体基因修饰的免疫效应细胞或重新引入免疫效应细胞的经基因修饰的祖细胞(这些祖细胞在引入到受试者中时分化为表达CAR的成熟免疫效应细胞)的方法。其中一种方法包括用根据本公开的核酸构建体离体转导外周血T细胞,并且将转导的细胞返回到受试者中。

[0161] 嵌合抗原受体和对应抗体的结合特性

[0162] 如本文所使用的,术语“结合”是在嵌合抗原受体或对应抗体(或双特异性抗体)与例如预先确定的抗原如细胞表面蛋白或其片段(或与和HLA分子等细胞表面蛋白结合的抗原)结合的上下文中讨论的。结合通常是指最少两个实体或分子结构之间的相互作用或缔合,如抗原结合结构域:抗原相互作用。

[0163] 例如,当通过例如表面等离子体共振(SPR)技术在BIAcore 3000仪器中使用抗原作为配体和抗体或嵌合抗原受体作为分析物(或抗配体)进行测定时,结合亲和力通常对应于约 10^{-7} M或更低(如约 10^{-8} M或更低,如约 10^{-9} 或更低)的 K_D 值。还常规使用如荧光激活细胞分选(FACS)结合测定等基于细胞的结合策略,并且FACS数据与其他方法具有较强相关,如放射性配体竞争结合和SPR(Benedict, CA, J Immunol Methods, 1997, 201(2):223-31, Geuijen, CA等人, J Immunol Methods, 2005, 302(1-2):68-77)。

[0164] 因此,本公开的嵌合抗原受体或对应抗体(或双特异性抗体)与预定抗原或细胞表面分子(受体)结合,其亲和力对应于比其与非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力的 K_D 值低至少十倍的 K_D 值。如本文所描述的,本公开的嵌合抗原受体或对应抗体可以与HLA呈递的MAGE-A4抗原,例如HLA-A2呈递的MAGE-A4抗原结合。根据本公开,具有等于或小于非特异性抗原十倍的 K_D 值的嵌合抗原受体或对应抗体的亲和力可以被认为是不可检测的结合。

[0165] 术语“ K_D ”(M)是指特定抗原结合结构域与抗原相互作用的解离平衡常数,或对应抗体与抗原的解离平衡常数。 K_D 与结合亲和力之间存在反比关系,因此 K_D 值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语“较高亲和力”或“较强亲和力”涉及较高的形成相互作用的能力并因此涉及较小的 K_D 值,并且相反,术语“较低亲和力”或“较弱亲和力”涉及较低的形成相互作用

用的能力,并且因此 K_D 值更大。在一些情况下,与特定分子(例如,嵌合抗原受体或对应抗体)对另一个相互作用的配偶体分子(例如,抗原Y)的结合亲和力相比,该特定分子(例如,嵌合抗原受体或对应抗体)对与其相互作用的配偶体分子(例如,抗原X)更高的结合亲和力(或 K_D)可以表述为如下确定的结合比率:将较大的 K_D 值(较低或较弱的亲和力)除以较小的 K_D (较高或较强的亲和力),例如视情况可以表述为5倍或10倍大的结合亲和力。

[0166] 术语“ k_d ”(秒⁻¹或1/秒)是指特定抗原结合结构域与抗原相互作用的解离速率常数,或嵌合抗原受体或对应抗体的解离速率常数。所述值也称为 k_{off} 值。

[0167] 术语“ k_a ”(M⁻¹×秒⁻¹或1/M)是指特定抗原结合结构域与抗原相互作用的缔合速率常数,或嵌合抗原受体或对应抗体的缔和速率常数。

[0168] 术语“ K_A ”(M⁻¹或1/M)是指特定抗原结合结构域与抗原相互作用的缔合平衡常数,或嵌合抗原受体或对应抗体的缔合平衡常数。通过将 k_a 除以 k_d 获得缔合平衡常数。

[0169] “EC50”或“EC₅₀”是指半数最大有效浓度,其包括在指定的暴露时间后诱导介于基线与最大值中间的应答的抗体或嵌合抗原受体浓度。EC₅₀本质上表示嵌合抗原受体或抗体(例如双特异性抗体)的浓度,在此浓度下观察到其最大效应的50%。在某些实施方案中,EC₅₀值等于本公开的嵌合抗原受体或对应抗体与表达抗原(例如,肿瘤相关抗原如MAGE-A4)的细胞产生半数最大结合的浓度,如通过例如FACS结合测定和/或T细胞报告基因/抗原呈递细胞(APC)生物测定所确定的。因此,观察到具有增加的EC₅₀或半数最大有效浓度值的降低的或较弱的结合。

[0170] 在一个实施方案中,降低的结合可以定义为增加的双特异性抗体、抗原结合片段、嵌合抗原受体或对应抗体的EC₅₀浓度,其使得能够结合半数最大量的靶细胞。

[0171] 抗体和嵌合抗原受体的序列变体

[0172] 与衍生对应抗体的单独抗原结合结构域的对种系序列相比,本公开的抗体、抗原结合片段和嵌合抗原受体可以在重链和轻链可变结构域的框架区(FR)和/或互补决定区(CDR)中包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文所公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本公开的抗体、抗原结合片段和嵌合抗原受体可包含源自本文公开的示例性CDR或可变区氨基酸序列中的任一者的抗原结合结构域,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生对应抗体的种系序列的对应残基或突变为另一个人种系序列的对应残基或突变为对应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域的普通技术人员可以容易地产生包括一个或多个个体种系突变或其组合的许多抗体。在某些实施方案中, V_H 结构域和/或 V_L 结构域内的框架和/或CDR残基的全部突变回在最初衍生抗原结合结构域的原始种系序列中所发现的残基。在其他实施方案中,仅将某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内所发现的突变后的残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变后的残基。在其他实施方案中,框架中和/或一个或多个CDR残基的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生抗原结合结构域的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应的残基。此外,本发明的抗原结合结构域可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个体残基突变为特定种系序列的对应残基,而与原始种系序列不同的某些其他残基可以维持或突变为不同种系序列的对应残基。

[0173] 嵌合抗原受体和对应抗体的生物特性

[0174] 本公开提供了抗体(包括双特异性抗体)、抗原结合片段和嵌合抗原受体(CAR),它们具有源自结合人MAGE-A4或人MAGE-A4和CD3两者的抗体的抗原结合结构域。如本文所描述的,双特异性抗体可用于生成与双特异性抗体具有类似特性的CAR。因此,本文所描述的且归因于双特异性抗体的特性同样适用于CAR。例如,本公开包括以小于2nM的 EC_{50} 值和大于1900的S/N比结合人MAGE-A4的抗MAGE-A4抗体,如通过下文关于实施例2所述的基于流式细胞术的肽脉冲测定所评估的。作为另一个示例,本公开提供了以约5至大于300范围内的S/N比结合一种或多种MAGE-A4相关肽的抗MAGE-A4抗体,如通过实施例2的基于流式细胞术的肽脉冲测定所评估的,并且如实施例3中所详述的。作为另一个示例,本公开提供了以约5至大于240范围内的S/N比结合MAGE-A4相关肽中的一者或多者的抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体,如通过实施例2的基于流式细胞术的肽脉冲测定所评估的,并且如实施例3中所详述的。

[0175] 本公开还提供了在T细胞报告基因/抗原呈递细胞(APC)生物测定中表现出显著活性的抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体,如下文实施例4中所详述的。具体地,本公开的抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体可活化NF- κ B依赖性T细胞(例如,Jurkat细胞)基因转录/翻译,如在表达MAGE-A4和HLA-A2的APC(例如,IM9和U266B1细胞)存在下通过荧光素酶表达所测量的,具有小于3.2nM(U266B1细胞)或小于0.75nM的 EC_{50} 值。在T细胞报告基因/APC生物测定中包括抗CD28抗体可调节抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体的活性,作为CD80和CD86的内源性水平的函数,如下文实施例4中所详述的。

[0176] 本公开还提供了在使用一种或多种MAGE-A4相关肽的上文讨论的T细胞报告基因/抗原呈递细胞(APC)生物测定中表现出显著活性的抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体,如下文实施例5中所详述的。具体地,当在携带荧光素酶报告基因的T细胞和用AOX1₇₉₅₋₈₀₃脉冲的T2细胞的存在下孵育时,就刺激的报告基因活性而言,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体表现出低于一纳摩尔的 EC_{50} 值(例如,对于具有高亲和力CD3臂的双特异性抗体为2.10E-11M,对于具有中等亲和力CD3臂的双特异性抗体为3.30E-10M)。另外,当在携带荧光素酶报告基因的T细胞和用SHTN1₁₉₈₋₂₀₆脉冲的T2细胞的存在下孵育时,就刺激的报告基因活性而言,抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体可表现出纳摩尔级的 EC_{50} 值(例如,对于具有高亲和力CD3臂的双特异性抗体为1.30E-9M,对于具有中等亲和力CD3臂的双特异性抗体为3.5E-9M)。

[0177] 本公开还提供了能够引导T细胞(例如,从人PBMC分离的CD8+T细胞)针对肿瘤细胞(例如,MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄抗原呈递HLA-A2阳性IM9细胞)的应答的抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体,如通过基于成像的多重原代T细胞杀伤测定所评估的,如下文实施例6中所详述的。具体地,本公开的某些抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体在低于10nM(例如,6.6nM)的浓度下能够由于抗体依赖性T细胞介导的应答而将肿瘤细胞活力降低至低于50%(例如,38%)。在肿瘤细胞内源性表达CD80和CD86的情况下,通过将抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体与抗CD28抗体共孵育可至少部分地阻断这种活力的降低,这可能至少部分归因于抗CD28抗体阻断了CD28与CD80和CD86的相互作用。

[0178] 本公开还提供了当在肿瘤细胞(例如,MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄抗原呈递HLA-A2阳性IM9细胞)和T细胞(例如,从人PBMC分离的CD8+T细胞)的存在下孵育时能够刺激细胞因子释放的抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体,如下文实施例7中所详述的。具体地,本公开提供了相比

于肿瘤和T细胞缺乏抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体条件下的细胞因子释放,能够刺激细胞因子释放(例如,IL2、IFN- γ)释放大于2倍的抗MAGE-A4×抗CD3双特异性抗体。

[0179] 本公开还提供了具有源自对应抗体的抗原结合结构域的嵌合抗原受体,这些对应抗体与表达内源性MAGE-A4的人细胞系特异性结合,如通过FACS结合测定所确定的。

[0180] 本公开还提供了表达MAGE-A4特异性嵌合抗原受体的工程化细胞,这些工程化细胞(i)被表达MAGE-A4的细胞活化(参见实施例8)并且/或者(ii)在携带人多发性骨髓瘤或黑素瘤异种移植物的免疫受损小鼠中展现出肿瘤生长的抑制。

[0181] 抗原结合结构域的制备

[0182] 对特定抗原(例如,MAGE-A4)具有特异性的本公开的抗体(包括双特异性抗体)和嵌合抗原受体的抗原结合结构域可通过本领域已知的任何抗体生成技术来制备。在某些实施方案中,本公开的对应抗体的个体组分中的一种或多种个体组分(例如,重链和轻链)源自嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。制备此类抗体的方法是本领域熟知的。例如,可以使用VELOCIMMUNE™技术制备重链和/或轻链中的一条或多条重链和/或轻链。使用VELOCIMMUNE™技术(或任何它他人抗体产生技术),将高亲和力嵌合抗体最初分离为具有人可变区和小鼠恒定区的特定抗原(例如,MAGE-A4)。对抗体进行表征和选择以获得期望的特性,包括亲和力、中和性、选择性、表位等。如本文所讨论的,这些人可变区(或CDR)随后可以并入到嵌合抗原受体的抗原结合结构域中。在其他示例中,两种不同抗原(例如,抗MAGE-A4和抗CD3)可相对于彼此适当地排列,以通过常规方法产生本公开的双特异性抗原结合分子(例如,以及抗体、CAR或任一者的抗原结合片段)。在某些实施方案中,本公开的多特异性抗原结合分子的个体组分(例如,重链和轻链)中的一者或多者源自嵌合抗体、人源化抗体或完全人源化抗体。

[0183] 多核苷酸和载体

[0184] 本公开还提供了编码本文所讨论的抗体(或其部分)和嵌合抗原受体的多核苷酸和载体。

[0185] 在各种实施方案中,多核苷酸可包含表达盒或表达载体(例如,用于引入到细菌宿主细胞中的质粒或用于转染昆虫宿主细胞的病毒载体(如杆状病毒载体)或用于转染哺乳动物宿主细胞的质粒或病毒载体(如慢病毒或腺相关病毒))。

[0186] 在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:22的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在其他实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:104的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:105的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:83的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:10的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:17的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:18的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:20的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:54的核苷酸序列的核酸分子,或包

括包含编码SEQ ID NO:55的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:62的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:63的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:68的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:69的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:70的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:71的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:72的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:73的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包括包含SEQ ID NO:80的核苷酸序列的核酸分子,或包括包含编码SEQ ID NO:81的多肽序列的核苷酸序列的核酸分子。关于上述序列标识号,在本公开的范围内,多核苷酸和/或载体包括其任何亚序列,如一个或多个HCDR、LCDR等。在各种实施方案中,多核苷酸和/或载体包含编码SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0187] 对表达嵌合抗原受体的免疫细胞进行工程化的方法

[0188] 本公开提供了制备用于免疫疗法的免疫细胞的方法,包括将编码本文所述的MAGE-A4特异性嵌合抗原受体中的一者的多核苷酸或载体离体引入到此类免疫细胞中。此类免疫细胞可以是自体的或同种异体的。

[0189] 本公开提供了包含编码本文所讨论的MAGE-A4特异性嵌合抗原受体中的一者的多核苷酸或慢病毒载体的免疫细胞。在一些实施方案中,这些免疫细胞用于免疫疗法(例如,癌症的治疗)。

[0190] 本公开提供了对免疫细胞进行基因修饰以使它们更适合于同种异体移植的方法。根据第一方面,例如通过使表达如WO 2013/176915中描述的T细胞受体(TCR)的一种或多种组分的至少一个基因灭活,可以使免疫细胞成为同种异体的,这可以与编码或调节HLA或 β 2m蛋白表达的基因失活组合。因此,移植物抗宿主综合征和移植物排斥的风险显著降低。根据本公开的另外的方面,通过使编码充当“免疫检查点”的蛋白质的基因灭活,可以进一步操纵免疫细胞以使免疫细胞更加活跃或限制衰竭,这些免疫检查点充当T细胞活化的调节剂如PD1或CTLA-4。

[0191] 工程化免疫细胞

[0192] 本公开还提供了包含如本文所描述的嵌合抗原受体的免疫细胞(例如,工程化免疫细胞)。在一些情况下,免疫细胞是免疫效应细胞。在一些情况下,免疫细胞是T细胞。在一些情况下,免疫细胞是选自炎性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞或辅助性T淋巴细胞的T淋巴细胞。在一些情况下,免疫细胞是CD8+细胞毒性T淋巴细胞。

[0193] 在一些实施方案中,工程化免疫细胞是包含嵌合抗原受体的人T细胞,该嵌合抗原受体从N端至C端包含:(a)包括抗MAGE-A4单链可变片段(scFv)结构域的细胞外配体结合结构域,该抗MAGE-A4 scFv结构域包含轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR);(b)铰链;(c)跨膜结构域;和(d)包括共刺激结构域和信号传导结构域的细胞质结构域。

[0194] 在一些实施方案中,工程化人T细胞的scFv结构域包括包含SEQ ID NO:2/10的氨基酸序列的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在一些情况下,铰链包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些情况下,跨膜结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在一些情况下,共刺激结

构域是4-1BB共刺激结构域。在一些情况下,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一些情况下,信号传导结构域是CD3 ζ 信号传导结构域。在一些情况下,CD3 ζ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0195] 在各种实施方案中,工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的嵌合抗原受体。在各种实施方案中,工程化人T细胞包括包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的嵌合抗原受体。

[0196] 生物等效物

[0197] 本公开提供了抗体和嵌合抗原受体以及表达这些嵌合抗原受体的工程化细胞,其具有与本文所公开的示例性分子的氨基酸序列不同但保留以下能力的氨基酸序列:结合MAGE-A4(在双特异性抗体的情况下为CD3)、在存在表达MAGE-A4的细胞的情况下活化表达嵌合抗原受体的免疫细胞或抑制表达MAGE-A4的肿瘤细胞的生长或增殖。当与亲本序列比较时,此类变体分子可以包括氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代,但展现出与所描述的抗原结合分子的生物活性基本上等效的生物活性。

[0198] 在一个实施方案中,如果表达本公开的嵌合抗原受体的两种工程化免疫细胞或本公开的两种抗原结合蛋白在安全性、纯度和效力方面没有临床意义上的差异,则它们是生物等效的。

[0199] 在一个实施方案中,如果患者可以在参考产品和生物产品之间转换一次或多次,而与不存在这种转换的持续治疗相比没有预期的副作用风险增加(包括免疫原性的临床显著变化或有效性降低),则两种工程化免疫细胞或两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0200] 在一个实施方案中,如果两种工程化免疫细胞或两种抗原结合蛋白均针对一种或多种使用条件通过一种或多种共同作用机制起作用(只要这些机制是已知的),则它们是生物等效的。

[0201] 在一个实施方案中,如果例如两种抗原结合蛋白或抗体是在相似的实验条件下以相同的摩尔剂量施用(无论是单剂量还是多剂量)时其吸收速率和吸收程度没有显著差异的药物等效物或药物替代物,则它们被认为是生物等效的。如果一些抗原结合蛋白在吸收程度上等效但其吸收速率不等效,则它们将被认为是等效物或药物替代物,并且它们还可被认为是生物等效的,因为这种有意的并且反映在标签上的吸收速率的差异在例如长期使用对于获得有效的体内药物浓度并非必需的,并且对于所研究的特定药物产品而言也被认为是医学上无关紧要的。

[0202] 生物等效性可通过体内和体外方法来证明。生物等效性测量包括,例如,(a)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量血液、血浆、血清或其他生物流体中工程化细胞的浓度作为时间的函数;(b)与人体内生物利用度数据相关并能合理预测人体内生物利用度数据的体外试验;(c)在人或其他哺乳动物中进行的体内试验,其中测量工程化细胞(或其靶标)的适当急性药理学效果作为时间的函数;以及(d)在建立工程化细胞的安全性、有效性或生物利用度或生物等效性的良好控制的临床试验中。

[0203] 可以通过例如对残基或序列进行各种取代或缺失非生物活性所必需的末端或内部残基或序列来构建本文所阐述的示例性工程化细胞的生物等效变体。

[0204] 可以通过例如对残基或序列进行各种取代或缺失非生物活性所必需的末端或内部残基或序列来构建本文所阐述的示例性双特异性抗原结合分子的生物等效变体。例如,

可以缺失非生物活性所必需的半胱氨酸残基或用其他氨基酸替代,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫键。在其他背景下,生物等效抗原结合蛋白可包括本文所阐述的示例性双特异性抗原结合分子的变体,这些变体包含改变分子的糖基化特征的氨基酸变化,例如消除或去除糖基化的突变。

[0205] 物种选择性和物种交叉反应性

[0206] 根据本公开的某些实施方案,提供了与人MAGE-A4结合但不与来自其他物种的MAGE-A4结合的抗原结合结构域。还提供了也与人AOX1结合但不与来自其他物种的AOX1结合的抗MAGE-A4抗原结合结构域。还提供了与人SHTN1结合但不与来自其他物种的SHTN1结合的抗MAGE-A4抗原结合结构域。本公开还提供了与人MAGE-A4结合并且与来自一个或多个非人物种的MAGE-A4结合的抗原结合结构域。本公开还提供了与人AOX1结合并且与来自一种或多种非人物种的AOX1结合的抗MAGE-A4抗原结合结构域。本公开还提供了与人SHTN1结合并且与来自其他物种的SHTN1结合的抗MAGE-A4抗原结合结构域。在一些实施方案中,本公开的抗原结合结构域与MAGE-A4 286-294或AOX1 795-803和/或SHTN1 198-206结合。在一些实施方案中,抗原结合结构域结合的MAGE-A4和/或AOX1和/或SHTN1(例如,MAGE-A4 286-294或AOX1 795-803或SHTN1 198-206)通过HLA例如HLA-A2呈递在细胞表面上。

[0207] 根据本发明的某些示例性实施方案,提供了抗原结合结构域,这些抗原结合结构域与人MAGE-A4和/或MAGE-A4相关肽并且视情况而定可以与小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩MAGE-A4和/或MAGE-A4相关肽中的一者或多者结合或不与其结合。此外,与MAGE-A4和/或MAGE-A4相关肽的结合可以在MHC呈递的MAGE-A4(或MAGE-A4-相关肽)(如HLA呈递的MAGE-A4)的背景下进行。示例性HLA呈递的MAGE-A4是HLA-A2结合的人MAGE-A4。

[0208] 工程化免疫细胞的活化和扩增

[0209] 无论是在工程化细胞(例如,T细胞)的基因修饰之前还是之后,即使本公开的经基因修饰的免疫细胞独立于抗原结合机制而被活化和增殖,本公开的免疫细胞(特别是T细胞)也可通常使用例如如以下专利中所描述的方法来进一步活化和扩增:美国专利第6,352,694号、第6,534,055号、第6,905,680号、第6,692,964号、第5,858,358号、第6,887,466号、第6,905,681号、第7,144,575号、第7,067,318号、第7,172,869号、第7,232,566号、第7,175,843号、第5,883,223号、第6,905,874号、第6,797,514号、第6,867,041号以及美国专利申请公开第20060121005号。T细胞可以在体外或体内扩增。

[0210] 通常,本公开的T细胞可以通过与刺激T细胞表面上的CD3 TCR复合物和共刺激分子的药剂接触以产生T细胞的活化信号,从而进行扩增。例如,如钙离子载体A23187、佛波醇12-肉豆蔻酸13-乙酸酯(PMA)或促有丝分裂凝集素如植物血凝素(PHA)等化学物质可以用于产生T细胞的活化信号。

[0211] 作为非限制性示例,可在体外刺激T细胞群,如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗CD2抗体接触,或通过与蛋白激酶C活化剂(例如,苔藓抑素)以及钙离子载体接触。对于辅助分子在T细胞表面的共刺激,使用结合辅助分子的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,可以将T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。适合T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如,最小必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 5(龙沙公司(Lonza))),所述培养基可以含有增殖和活力所必需的因子,这些因子包括本领域技术人

员已知的用于细胞生长的血清(例如,胎牛或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN-g、1L-4、1L-7、GM-CSF、IL-10、IL-2、1L-15、TGF β 和TNF- α 或任何其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、血浆酸盐和如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇等还原剂。培养基可以包括RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 1和X-Vivo 20、Optimizer,其添加有氨基酸、丙酮酸钠和维生素,其无血清或补充有适量血清(或血浆)或一组限定的激素和/或足以使T细胞生长和扩增的量的一个或多个细胞因子。抗生素(例如,青霉素和链霉素)仅在实验培养时包括,而在培养待注入受试者体内的细胞时不包括。靶细胞保持处于支持生长所需的条件下,例如适当的温度(例如,37°C)和大气(例如,空气加5%的O₂)。暴露于不同刺激时间的T细胞可能展现出不同的特性。

[0212] 在一些实施方案中,可以通过与组织或细胞共培养来扩增细胞。细胞也可以在体内扩增,例如在将所述细胞施用于受试者后在受试者的血液中扩增。

[0213] 治疗性制剂和施用

[0214] 如本文所使用的,术语“有效量”和“治疗有效量”是指活性治疗剂的足以产生期望的治疗性应答而没有不适当的不良副作用(如毒性、刺激或过敏反应)的量。显然,具体的“有效量”将随某些因素而变化,诸如所治疗的具体病状、患者的身体状况、所治疗的动物类型、治疗的持续时间、协同治疗(如果有的话)的性质、所采用的具体制剂以及化合物或其衍生物的结构。在这种情况下,如果一个量导致以下结果中的一者或多者(但不限于此),则认为该量是治疗有效的:(a)抑制肿瘤生长(例如,表达MAGE-A4的癌症);以及(b)表达MAGE-A4的癌症的逆转或稳定。

[0215] 施用于患者的抗原结合分子的剂量可以根据患者的年龄和体型、目标疾病、病状、施用途径等而变化。通常根据体重或体表面积计算优选的剂量。当本发明的抗体或双特异性抗原结合分子用于成年患者的治疗目的时,可能是有利的是,通常以约0.01mg/kg至约20mg/kg体重、更优选地约0.02mg/kg至约7mg/kg体重、约0.03mg/kg至约5mg/kg体重或约0.05mg/kg至约3mg/kg体重的单剂量静脉内施用本发明的双特异性抗原结合分子。根据病状的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。施用双特异性抗原结合分子的有效剂量和方案可凭经验确定;例如,可通过定期评估来监测患者的进展,并相应地调整剂量。此外,剂量的种间缩放可以使用本领域熟知的方法(例如,Mordenti等人,1991,Pharmaceut.Res.8:1351)进行。

[0216] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如,包封在脂质体、微颗粒、微胶囊内、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见例如,Wu等人,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入的方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以通过任何方便的途径施用组合物,例如通过输注或团注注射、通过上皮或皮肤粘膜内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。

[0217] 可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送本发明的药物组合物。另外,就皮下递送而言,笔递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔递送装置通常利用含有药物组合物的可更换药筒。一旦已经施用了药筒内的全部药物组合物,并且药筒是空的,就可以轻易地丢弃空药筒,并且用含有药物组合物的新药筒更换。然后可以重复使用笔递送装置。在一次性笔递送装置

中,没有可更换的药筒。相反,一次性笔递送装置预装有固持在装置内的贮存器中的药物组合物。一旦贮存器中的药物组合物清空,就丢弃整个装置。

[0218] 许多可重复使用的笔递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物。示例包括但不限于:AUTOPEN™(英国伍德斯托克的欧文芒福德公司(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™笔(瑞士波道夫的Disetronic医疗系统公司(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland))、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(印第安纳州印第安纳波利斯的礼来公司(Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind.))、NOVOPEN™I、II和III(丹麦哥本哈根的诺和诺德公司(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark))、NOVOPEN JUNIOR™(丹麦哥本哈根的诺和诺德公司)、BD™笔(新泽西州富兰克林湖的贝迪医疗公司(Becton Dickinson))、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™以及OPTICLIK™(德国法兰克福的赛诺菲公司(sanofi-aventis, Frankfurt, Germany)),仅举几例。应用于皮下递送的本发明的药物组合物的一次性笔递送装置的示例包括但不限于:SOLOSTAR™笔(赛诺菲公司)、FLEXPEN™(诺和诺德公司)和KWIKPEN™(礼来公司)、SURECLICK™自动注射器(加利福尼亚州的千橡市安进公司(Amgen, Thousand Oaks, Calif.))、PENLET™(德国斯图加特的Haselmeier公司(Haselmeier, Stuttgart, Germany))、EPIPEN(Dey公司(Dey, L.P.))以及HUMIRA™笔(伊利诺伊州雅培科技园的雅培实验室(Abbott Labs, Abbott Park Ill.)),仅举几例。

[0219] 在某些情况下,可以在控释系统中递送药物组合物。在一个实施方案中,可使用泵(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.,14:201)。在另一个实施方案中,可使用聚合物材料;参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编辑),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Fla.。在又一个实施方案中,受控释放系统可以放置在组合物的靶标附近,因此仅需要全身剂量的一小部分(参见例如,Goodson,1984,Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页)。其他受控释放系统在Langer,1990,Science 249:1527-1533的评论中讨论。

[0220] 可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。可以通过已知的方法制备这些可注射制剂。

[0221] 有利地是,将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成适于配合一定剂量的活性成分的单位剂量的剂型。这种单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓿)、栓剂等。上述抗体的含量通常为每单位剂量的剂型中有约5mg至约500mg;特别是在注射剂形式中,优选的是上述抗体的含量为约5mg至约100mg,对于其他剂型为约10mg至约250mg。

[0222] 根据本公开的细胞或细胞群的施用可通过任何方便的方式进行,包括通过雾化吸入、注射、摄入、灌输、植入或移植。可以将本文所描述的组合物皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌内、通过静脉内或淋巴内注射或腹腔内施用于患者。在一个实施方案中,本公开的细胞组合物优选地通过静脉注射施用。

[0223] 细胞或细胞群的施用可以由以下组成:每kg体重施用 10^4 个至 10^9 个细胞,优选地每kg体重施用 10^5 个至 10^6 个细胞(包括这些范围内的细胞数的所有整数值)。可以按一个或多个剂量施用细胞或细胞群。在一些实施方案中,有效量的细胞作为单剂量施用。在一些实施方案中,有效量的细胞在一段时间内作为多于一个剂量施用。施用时间在主治医师的判断

范围内,并且取决于患者的临床状况。细胞或细胞群可以从任何来源获得,如血库或供体。虽然个体需求各不相同,但对用于治疗特定疾病或病状的给定细胞类型的有效量的范围的确定在本领域技术范围内。有效量意指提供治疗或预防益处的量。施用的剂量将取决于接受者的年龄、健康和体重、同期治疗(如果有的话)的种类、治疗频率和期望的效果的性质。

[0224] 在一个实施方案中,有效量的细胞或包括那些细胞的组合物通过肠胃外施用。这种施用可以是静脉内施用。在一些情况下,施用可以通过注射到肿瘤内直接进行。

[0225] 在本公开的某些实施方案中,将细胞与任何数量的相关治疗方式联合施用(例如,前者先施用、两者同时施用或前者后施用)于患者,这些相关治疗方式包括但不限于用抗病毒疗法、西多福韦(cidofovir)和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也称为ARA-C)等药剂的治疗或用于MS患者的那他珠单抗(natalizumab)治疗或用于银屑病患者依法利兹单抗(efaliztimab)治疗或用于PML患者的其他治疗。在另外的实施方案中,本公开的T细胞可以与可以与化学疗法、放射、如环孢菌素(cyclosporin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、麦考酚酯(mycophenolate)和FK506等免疫抑制剂、抗体或其他免疫去除剂如CAMPATH、抗CD3抗体或其他抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨(fludarabine)、环孢菌素、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、霉酚酸(mycophenolic acid)、类固醇、FR901228、细胞因子和辐射组合使用。

[0226] 在另外的实施方案中,本公开的细胞组合物与骨髓移植、使用化疗药剂(如氟达拉滨)的T细胞消融疗法、外束放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体(如OKT3或CAMPATH)联合施用(例如,前者先施用、两者同时施用或前者后施用)于患者。在另一个实施方案中,在B细胞消融疗法如与CD20反应的药剂,例如美罗华(Rituxan)后,施用本公开的细胞组合物。例如,在一个实施方案中,受试者可以经历标准治疗,其中高剂量化学疗法之后是外周血干细胞移植。在某些实施方案中,在移植后,受试者接受本公开的扩增的免疫细胞的输注。在另外的实施方案中,在外科手术之前或之后施用扩增的细胞。在某些实施方案中,在施用本公开的扩增的免疫细胞之前,可以使用任何方式(例如,外科手术、化学疗法或放射疗法)来减少肿瘤负荷。在一个实施方案中,在施用本公开的工程化细胞之前减少肿瘤负荷可以降低细胞因子释放综合征或细胞因子风暴(一种可能与CAR T细胞疗法相关的副作用)的可能性或对其进行预防。

[0227] 治疗性应用

[0228] 本公开提供了包含表达本公开的嵌合抗原受体的工程化细胞(例如,T细胞)以及药学上可接受的媒剂的组合物。本公开还提供了包含抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的媒剂的组合物。在一些情况下,工程化细胞、抗体或抗原结合片段形成药物,特别是用于免疫疗法。在一些情况下,工程化细胞、抗体或抗原结合片段用于治疗癌症(例如,多发性骨髓瘤或黑素瘤)。在一些情况下,工程化细胞、抗体或抗原结合片段用于制备用于免疫疗法和/或治疗癌症(例如,表达MAGE-A4的癌症)的药物。

[0229] 本公开提供了包括向有需要的受试者施用治疗组合物的方法,该治疗组合物包含抗体(例如,双特异性抗体)或其抗原结合片段,以及/或者表达如本文所讨论的嵌合抗原受体的工程化细胞(例如,T细胞)。治疗组合物可以包括表达如本文所公开的任何嵌合抗原受体的细胞和药学上可接受的载体、稀释剂或媒剂。在另外的或另选的示例中,治疗组合物包含如本文所讨论的抗体和/或抗原结合片段。如本文所使用的,表述“有需要的受试者”意指

表现出一种或多种癌症症状或征兆(例如,患有表达MAGE-A4的肿瘤或患有本文提及的癌症中的任何癌症的受试者)或者以其他方式受益于MAGE-A4活性的抑制或降低或者MAGE-A4+细胞的耗竭的人或非人动物。

[0230] 本公开的工程化细胞和/或抗体和抗原结合片段尤其可以用于治疗其中免疫应答的刺激、活化和/或靶向将是有益的任何疾病或病症。具体地,本公开的工程化细胞和/或抗体和抗原结合片段可以用于治疗、预防和/或改善与MAGE-A4表达或活性或者MAGE-A4+细胞增殖相关或由其介导的任何疾病或病症。可以使用本公开的工程化细胞和/或抗体和抗原结合片段抑制或杀伤表达MAGE-A4的细胞包括例如多发性骨髓瘤细胞、黑素瘤细胞或其他实体瘤细胞。

[0231] 本公开的工程化细胞和/或抗体和抗原结合片段可以用于治疗与MAGE-A4表达相关的疾病或病症,该疾病或病症包括例如癌症,包括但不限于多发性骨髓瘤、滑膜肉瘤、食道癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌和黑素瘤。本公开的工程化细胞和/或抗体和抗原结合片段通常可以用于治疗表达MAGE-A4的肿瘤。根据本公开的其他相关实施方案,提供了包括向患有表达MAGE-A4的肿瘤(包括来自上文所列癌症的肿瘤)的患者施用如本文所公开的工程化细胞和/或抗体和抗原结合片段的方法。本领域已知的如肿瘤扫描等分析/诊断方法可以用于确定患者是否患有此类肿瘤、疾病或病状。

[0232] 本公开还提供了用于治疗受试者的残留癌症的方法。如本文所使用的,术语“残留癌症”意指在用抗癌疗法治疗后受试者中的一个或多个癌细胞的存在或持续存在。

[0233] 根据某些方面,本公开提供了用于治疗与MAGE-A4表达相关的疾病或病症(例如,癌症)的方法,该方法包括在确定受试者患有该疾病或病症后,向受试者施用本文别处所描述的工程化细胞群和/或抗体和抗原结合片段。例如,本公开提供了用于治疗疾病或病症的方法,该方法包括在受试者接受其他免疫疗法或化学疗法后1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间向患者施用工程化免疫细胞。

[0234] 本文所讨论的治疗可以是改善性的、治愈性的或预防性的。治疗可以是自体免疫疗法的一部分或同种异体免疫疗法的一部分。自体意指用于治疗患者的细胞、细胞系或细胞群源自患者或人白细胞抗原(HLA)相容的供体。同种异体意指用于治疗患者的细胞、细胞系或细胞群不是源自患者而是源自供体。

[0235] 本文描述了可与所公开的方法一起使用的细胞。治疗可以用于治疗被诊断患有以表达MAGE-A4的细胞,尤其是表达MAGE-A4的细胞过多为特征的恶性前或恶性癌症病状的患者。此类情况可以在癌症中找到。

[0236] 待用本公开的工程化细胞、抗体和抗原结合片段治疗的癌症类型包括但不限于多发性骨髓瘤、滑膜肉瘤、食道癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌和黑素瘤。

[0237] 本公开的组合物和方法可以用于治疗已表征为具有表达MAGE-A4的细胞或组织或被怀疑具有表达MAGE-A4的细胞或组织的受试者。例如,受益于根据本公开的治疗的受试者包括患有多发性骨髓瘤、滑膜肉瘤、食道癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌或黑素瘤的受试者。

[0238] 组合疗法

[0239] 本公开提供了包括将抗体/抗原结合片段(例如,双特异性抗体)和/或工程化细胞或包含本文所描述的任何嵌合抗原受体的细胞群与一种或多种另外的治疗剂组合施用的方法。可以与本公开的抗体/抗原结合片段和/或细胞或细胞群组合或与之组合施用的示例性的另外的治疗剂包括例如抗肿瘤剂(例如,化学治疗剂,包括美法仑(melphalan)、长春新碱(安可平(Oncovin))、环磷酰胺(癌得星(Cytosan))、依托泊苷(VP-16)、多柔比星(阿霉素(Adriamycin))、脂质体多柔比星(多喜(Doxil))、奥博达莫司汀(obendamine, 苯达莫司汀(Treanda))或已知对治疗受试者的浆细胞肿瘤有效的任何其他化学治疗剂)。在一些实施方案中,第二治疗剂包含类固醇。在一些实施方案中,第二治疗剂包含靶向疗法,这些靶向疗法包括批准用于治疗新诊断患者的沙利度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)和硼替佐米(bortezomib)。例如,来那度胺、泊马度胺(pomalidomide)、硼替佐米、卡非佐米(carfilzomib)、帕比司他(panobinostat)、伊沙佐米(ixazomib)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)和达雷木单抗(daratumumab)是用于有效治疗复发性骨髓瘤的第二治疗剂的示例。在某些实施方案中,第二治疗剂是包括放射疗法或干细胞移植的方案。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是免疫调节剂。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是蛋白酶体抑制剂,包括硼替佐米(Velcade[®])、卡非佐米(Kyprolis[®])、伊沙佐米(Ninlaro[®])。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,如帕比司他(Farydak[®])。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是单克隆抗体、抗体药物缀合物、可与抗肿瘤剂缀合或不缀合的双特异性抗体、检查点抑制剂或它们的组合。可以与本公开的抗原结合分子有益地组合施用的其他药剂包括细胞因子抑制剂,这些细胞因子抑制剂包括小分子细胞因子抑制剂和与如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18等细胞因子或其各自的受体结合的抗体。本公开的药物组合物(例如,包含如本文所公开的工程化细胞或细胞群的药物组合物)还可以作为包括选自以下的一种或多种治疗组合的治疗方案的一部分来施用:可以与浆细胞表面上的不同抗原相互作用的除本文所描述的单克隆抗体之外的单克隆抗体;其中一个臂与肿瘤细胞表面上的抗原结合而另一个臂与T细胞上的抗原结合的双特异性抗体;抗体药物缀合物;与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体;检查点抑制剂例如靶向PD-1或CTLA-4的检查点抑制剂;或它们的组合。在某些实施方案中,检查点抑制剂可以选自PD-1抑制剂,如派姆单抗(pembrolizumab)(Keytruda[®])、纳武利尤单抗(nivolumab)(Opdivo[®])或西米普利单抗(cemiplimab)(Libtayo[®])。在某些实施方案中,检查点抑制剂可以选自PD-L1抑制剂,如阿特珠单抗(atezolizumab)(Tecentriq[®])、阿维鲁单抗(avelumab)(Bavencio[®])或度伐鲁单抗(Durvalumab)(Imfinzi[®])。在某些实施方案中,检查点抑制剂可以选自CTLA-4抑制剂,如伊普利姆玛(ipilimumab)(Yervoy[®])。

[0240] 本发明还包括治疗组合,这些治疗组合包含本文所提及的抗体/抗原结合片段和/或工程化细胞或细胞群中的任一者以及VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvIII、cMet、IGF1R、B-raf、PDGFR- α 、PDGFR- β 、FOLH1(PSMA)、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、尿溶蛋白(uroplakin)或任何前述细胞因子中的一者或多者的抑制剂,其中该抑制剂是适体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗体片段(例如,Fab片段;F

(ab')₂片段;Fd片段;Fv片段;scFv;dAb片段;或其他工程化分子,如二抗体、三抗体、四抗体、微抗体和最小识别单元)。在一些实施方案中,本公开的抗体/抗原结合片段和/或工程化细胞或细胞群也可以作为还包括放射治疗和/或常规化学疗法的治疗方案的一部分施用。

[0241] 所述另外的治疗活性组分可以在施用本公开的工程化细胞之前、同时或之后不久施用; (出于本公开的目的,此类施用方案被认为是将工程化细胞与另外的治疗活性组分“组合”施用)。

[0242] 本公开提供了其中本公开的工程化细胞或细胞群与如本文别处所描述的另外的治疗活性组分中的一者或多者共同配制的药物组合物。

[0243] 施用方案

[0244] 根据本公开的某些实施方案,可以在限定的时间过程内向受试者施用多剂量的抗体/抗原结合片段和/或工程化细胞。根据此方面的方法包括向受试者依次施用多剂量的抗原结合分子和/或细胞。如本文所使用的,“依次施用”意指每个剂量在不同时间点施用于受试者,例如,在隔开预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)的不同日期。本公开提供了包括向患者依次施用单个初始剂量,随后是一个或多个第二剂量,并且任选地随后是一个或多个第三剂量的方法。

[0245] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指本公开的抗原结合分子和/或工程化细胞的时间施用序列。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;并且“第三剂量”是在第二剂量之后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量可以均含有相同量的抗原结合分子和/或工程化细胞,但是通常其在施用频率方面可能彼此不同。然而,在某些实施方案中,在治疗过程中初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中所含的抗原结合分子和/或工程化细胞的量彼此不同(例如,适当地调高或降低)。在某些实施方案中,在治疗开始时施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个或5个)剂量作为“负荷剂量”,然后是在较不频繁的基础上施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0246] 在本发明的一个示例性实施方案中,在紧接着前一剂量后1到26(例如,1、1^{1/2}、2、2^{1/2}、3、3^{1/2}、4、4^{1/2}、5、5^{1/2}、6、6^{1/2}、7、7^{1/2}、8、8^{1/2}、9、9^{1/2}、10、10^{1/2}、11、11^{1/2}、12、12^{1/2}、13、13^{1/2}、14、14^{1/2}、15、15^{1/2}、16、16^{1/2}、17、17^{1/2}、18、18^{1/2}、19、19^{1/2}、20、20^{1/2}、21、21^{1/2}、22、22^{1/2}、23、23^{1/2}、24、24^{1/2}、25、25^{1/2}、26、26^{1/2}或更多)周施用每个第二剂量和/或第三剂量。如本文所使用的,短语“紧接着前一剂量”意指按照多次施用的顺序,在没有中间剂量的情况下在按顺序施用下一个剂量之前施用于患者的剂量。

[0247] 根据本公开的此方面的方法可以包括向患者施用任意数量的第二剂量和/或第三剂量。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第二剂量。在其他实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第二剂量。同样地,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第三剂量。在其他实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第三剂量。

[0248] 在涉及多个第二剂量的实施方案中,每个第二剂量可以按与其他第二剂量相同的频率施用。例如,可以在紧接着前一剂量后1到2周向患者施用每个第二剂量。类似地,在涉及多个第三剂量的实施方案中,每个第三剂量可以按与其他第三剂量相同的频率施用。例

如,可以在紧接着前一剂量后2到4周向患者施用每个第三剂量。可替代地,向患者施用第二剂量和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。施用频率也可以在医师的治疗过程中根据临床检查后个体患者的需要进行调整。

[0249] 实施例

[0250] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制造和使用本公开的方法和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为是其发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是或接近大气压。

[0251] 实施例1:抗MAGE-A4抗体的生成

[0252] 通过用人MAGE-A4抗原(例如,针对mAb31339N2的hMAGE-A4286-294)和HLA-A2(HLA-A*02:01)免疫经基因修饰的小鼠(例如,包含编码人免疫球蛋白重链和 κ 轻链可变区的DNA的工程化小鼠)来获得抗MAGE-A4抗体。更具体地,经基因修饰的小鼠的基因组具有编码人HLA-A2的核苷酸序列(以及编码人免疫球蛋白重链和 κ 轻链可变区的序列),使得经遗传修饰的小鼠表达人HLA-A2,其中所述小鼠对人HLA-A2耐受,使得它们在用MAGE-A4抗原和HLA-A2免疫时产生特异性B细胞应答。

[0253] 在免疫之后,从各小鼠收集脾细胞,并且(1)将这些脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成融合瘤细胞,并且针对MAGE-A4特异性进行筛选,或者(2)使用人MAGE-A4片段作为结合并鉴别反应性抗体(抗原阳性B细胞)的分选试剂对这些脾细胞进行B细胞分选(如美国专利公开第2007/0280945A1号中所描述的)。

[0254] 最初分离出具有人可变区和小鼠恒定区的针对MAGE-A4的嵌合抗体。针对所需特征(包括亲和力、选择性等)表征和选择抗体。在实施例中,用所需的人恒定区(例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4恒定区)置换小鼠恒定区,以产生完全人抗MAGE-A4抗体(例如,使用mAbM31339N2(包含小鼠恒定区)来生成mAbH31339N2(包含人恒定区))。虽然所选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特性存在于可变区中。

[0255] 还通过使用高亲和力(7195P)CD3臂生成bsAb6054(HCVR1、LCVR1和LCVR2来自mAb31339并且HCVR2来自7195P)或使用中等亲和力(7221G)CD3臂生成bsAb6043(HCVR1、LCVR1和LCVR2来自mAb31339并且HCVR2来自7221G),将mAbM31339N2重新格式化为双特异性抗体。

[0256] 抗MAGE-A4抗体的重链和轻链可变区氨基酸和核酸序列:表1列出了本公开的所选抗MAGE-A4抗体的重链和轻链可变区以及重链和轻链CDR的氨基酸序列标识符。除了HCVR框架区3中的一个氨基酸不同之外,表1的mAb31339N和mAb31339N2序列是相同的;然而mAb31339N和mAb31339N2的CDR是相同的。对应的核酸序列标识符列于表2中。表15中提供了本文所包含的所有序列的汇总。

[0257] 表1:氨基酸序列标识符

		SEQ ID NO:						
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
[0258] mAb31339N	83	4	6	8	10	12	14	16
mAbM31339N2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAbH31339N2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAbM34852N	107	109	111	113	115	117	14	119

[0259] 表2:核酸序列标识符

		SEQ ID NO:						
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
[0260] mAbM31339N	82	3	5	7	9	11	13	15
mAbM31339N2	1	3	5	7	9	11	13	15
mAbH31339N2	1	3	5	7	9	11	13	15
[0261] mAbM34852N	106	108	110	112	114	116	13	118

[0262] 结合CD3和MAGE-A4的双特异性抗体的产生:使用其中将来自抗CD3抗体的重链与来自抗MAGE-A4抗体的重链和同源轻链进行组合的方法学,通过表3和表4中列出的序列构建包含抗CD3特异性结合结构域和抗MAGE-A4特异性结合结构域的双特异性抗体。

[0263] 因此,根据本实施例产生的双特异性抗体包含两个单独的抗原结合结构域(即,结合臂)。第一抗原结合结构域包含与源自抗MAGE-A4抗体的同源轻链可变区(“MAGE-A4-VL”)配对的源自抗MAGE-A4抗体的重链可变区(“MAGE-A4-VH”),并且第二抗原结合结构域包含与MAGE-A4-VL配对的源自抗CD3抗体的重链可变区(“CD3-VH”)。原则上,也可以使用来自抗CD3抗体的同源轻链可变区(“CD3-VL”)作为抗体两臂共有的轻链可变区。在本实施例中产生的所有双特异性抗体中使用相同的MAGE-A4-VH。bsAb6054抗体包括包含SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR的MAGE-A4结合臂和包含SEQ ID NO:73/10的HCVR/LCVR的CD3结合臂。bsAb6043抗体包括包含SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR的MAGE-A4结合臂和包含SEQ ID NO:55/10的HCVR/LCVR的CD3结合臂。

[0264] 用于构建抗CD3抗原结合臂和抗MAGE-A4结合臂的重链和轻链可变区以及重链和轻链CDR的氨基酸序列标识符列于表3中。对应的核酸序列标识符列于表4中。抗MAGE/抗CD3双特异性抗体由中等亲和力的CD3抗体(抗CD3-A;在本文中称为H4sH7221G或7221G)或高亲和力的CD3抗体(抗CD3-B;在本文中称为HpH4sH7195P或7195P)生成。第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域在本文中称为双特异性抗体的“臂”。在实施例中,一个臂包括包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCVR和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCVR,而另一个臂则包括包含SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HCVR和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCVR。

[0265] 表3:氨基酸序列标识符

		SEQ ID NO:						
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
[0266] mAbM31339N2	2	4	6	8	10	12	14	16
[0267] 抗 CD3-A	55	57	59	61	63	65	14	67
抗 CD3-B	73	75	77	79	63	65	14	67

[0268] 表4:核酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
[0269] mAbM31339N2	1	3	5	7	9	11	13	15
抗 CD3-A	54	56	58	60	62	64	13	66
抗 CD3-B	72	74	76	78	62	64	13	66

[0270] 实施例2:通过流式细胞术测定抗HLA-A2:MAGE-A4 (286-294) 抗体与用MAGE-A4 (286-294) 脉冲的T2细胞的结合

[0271] 在基于流式细胞术的肽脉冲测定中评估抗HLA-A2:MAGE-A4 286-294抗体 (mAbM31339N) 与HLA-A*02:01阳性T2(174CEM.T2) 细胞的细胞表面结合。为了脉冲,在37°C下将 1×10^6 个T2细胞与 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的人(h) B2M (EMD密理博公司 (EMD Millipore) 目录号475828) 和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的MAGE-A4 286-294肽在1mL AIM V培养基 (吉博公司 (Gibco) 目录号31035-025) 中一起孵育16小时。将细胞在染色缓冲液 ((不含钙和镁的PBS (康宁公司 (Corning), 商品号21-031-CV)+2%FBS (Seradigm, 批号238B15)) 中洗涤,用细胞分离缓冲液 (密理博公司, 目录号S-004-C) 收集,并重悬于染色缓冲液中。将经脉冲的细胞 (200,000个) 接种在96孔V底板 (爱思进公司 (Axygen), 目录号P-96-450V-C-S) 中,并用mAbM31339N或非结合对照抗体 (mAb1097) 的三倍连续稀释液 (1.7pM至100nM) 在4°C下染色30分钟。然后将细胞在染色缓冲液中洗涤一次,并在4°C下与 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的Alexa Fluor 647缀合的Fab'2抗小鼠Fc特异性二抗 (Jackson ImmunoResearch, 目录号115-606-071) 一起孵育30分钟。最后,将细胞用浓度为1:1000的绿色荧光活力染料 (分子探针公司 (Molecular Probes) 目录号L-34970, 重构于 $50 \mu\text{L}$ DMSO中) 染色。然后将细胞用稀释于PBS中的50%BD Cytotfix (BD公司, 目录号554655) 溶液洗涤并固定。在Intellicyt iQue流式细胞仪 (Intellicyt) 上运行样品,并且使用Forecyte分析软件 (Intellicyte) 分析结果以计算对活细胞进行门控之后的平均荧光强度 (MFI)。在Graphpad Prism中使用四参数逻辑方程在12点应答曲线上绘制MFI值,以计算 EC_{50} 值。每个剂量应答曲线的单独的二抗 (即无一抗) 也包含在分析中,作为三倍连续稀释的延续,并且表示为最低剂量。通过取剂量应答曲线上最高MFI与单独的二抗的孔中的MFI的比率来确定信噪比 (S/N)。 EC_{50} 值 (M) 和最大S/N示于表5中。mAbM31339N以1.7nM的 EC_{50} 和1933的最大S/N结合,而未检测到对照抗体 (mAb1097) 的结合,表明mAb31339N对MAGE-A4 (286-294) 具有强结合亲和力。参考表5,ND是指由于结合在测试抗体浓度范围内未达到饱和而无法准确测定的 EC_{50} 值。

[0272] 表5:抗HLA-A2:MAGE-A4 (286-294) 抗体与呈递MAGE-A4 (286-294) 的T2细胞的结合

mAb	EC_{50}	最大 S/N
[0273] mAbM31339N	1.7E-09	1933
mAb1097 (mIgG2a 同种型对照)	ND	1

[0274] 实施例3:抗HLA-A2:MAGE-A4抗体和MAGE-A4×CD3双特异性抗体与用MAGE-A4相关肽脉冲的T2细胞的结合。

[0275] 计算机计算策略 (Dhanik等人, BMC Bioinformatics 2016) 鉴定了几种预测与HLA-A*02:01形成复合物的MAGE-A4相关肽。鉴定结果汇总于表6中。

[0276] 表6:MAGE-A4 286-294肽和预测的脱靶肽的序列

肽 (基因名称和肽位置)	肽序列	SEQ ID NO
MAGE-A4 286-294	KVLEHVVRV	33
FN1 2182-2190	KVREEVVTV	40
AOX1 795-803	KVMCHVRRV	41
PSME2 145-153	KVLERVNAV	42
PCDHGC3 337-345	KVLVEVVDV	43
SHTN1 198-206	KVLEKCNRV	44
SMIM11A 4-12	KVLEHVPLL	45
RABGAP1L 408-416	FLLETVVRV	46
CNOT1 1965-1973	KVLGIVVGV	47
CARD8 170-178	MVLEHPARV	48
MRPL37 334-342	KVLEQPVVV	49

PLEKHH2 790-798	KVLQNVLRV	50
NBAS 2063-2071	KVLEGVVA	51
TEP1 2156-2164	AVEEHVVS	52
HEATR5A 1925-1933	KVLETLVTV	53

[0279] 在上述T2脉冲测定中评估了亲本抗体 (mAbH31339N2)、MAGE-A4×CD3 (7221G) 双特异性抗体 (bsAb6043) 和非结合同种型对照抗体 (mAb4241) 与表6所示的这些相关肽的结合。如上文实施例1中所述, bsAb6043抗体包括包含SEQ ID NO: 2/10的HCVR/LCVR的MAGE-A4结合臂和包含SEQ ID NO: 55/10的HCVR/LCVR的CD3结合臂。如表7中汇总的, 两种抗体结合MAGE-A4肽, 其中mAbH31339N2的S/N值为310, bsAb6043的S/N值为244, 基本上高于基线(无肽)。测试抗体表现出较低的与AOX1的结合, 其中mAbH31339N2的S/N值为131, bsAb6043的S/N值为110, 并且表现出较低的与SHTN1的结合, 其中两种抗体的S/N值均为5。未观察到与剩余肽的可检测结合, 并且对于所有测试的肽, 对照抗体结合均 ≤ 3 。

[0280] 表7: 抗HLA-A2:MAGE-A4 (286-294) 抗体与呈递MAGE-A4相关肽的T2细胞的结合

肽 (基因名称和肽位置)	抗体		
	mAbH31339N2 (S/N比)	bsAb6043 (S/N比)	mAb4241 (S/N比)
无肽	1	1	3
MAGE-A4 (286-294)	310	244	3
FN1 (2182-2190)	1	1	3
AOX1 (795-803)	131	110	3
PSME2 (145-153)	1	1	3
PCDHGC3 (337-345)	1	1	3
SHTN1 (198-206)	5	5	3
SMIM11A (4-12)	1	1	3
RABGAP1L (408-416)	1	1	3
CNOT1 (1965-1973)	1	1	3
CARD8 (170-178)	1	1	2
MRPL37 (334-342)	1	1	3
PLEKHH2 (790-798)	1	1	2
NBAS (2063-2071)	1	1	3
TEP1 (2156-2164)	1	1	3
HEATR5A (1925-1933)	1	1	3

[0282] 实施例4: 在T细胞报告基因/抗原呈递细胞 (APC) 生物测定中评估MAGE-A4×CD3双特异性抗体的活性

[0283] 在T细胞报告基因/抗原呈递细胞 (APC) 生物测定中评估MAGE-A4×CD3双特异性抗体的活性。为了生成测定细胞系,将Jurkat细胞用NF-κB依赖性萤火虫荧光素酶慢病毒报告基因载体(凯杰公司(Qiagen))转导并针对高荧光素酶活性对其进行单细胞分选以产生Jurkat/NF-κBLuc测定细胞系。利用内源性表达MAGE-A4和HLA-A*02:01的骨髓瘤细胞系IM9和U266B1细胞作为抗原呈递细胞(APC)。另外,使用MAGE-A4和HLA-A2阴性的Raji细胞作为对照。简而言之,将25,000个Jurkat/NF-κBLuc细胞混合于25μL测定培养基(含10%FBS和1%P/S/G的RPMI培养基)中并添加到Thermo-Nunc 96孔白板(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific)目录号136101)中,然后添加混合于25μL测定培养基中的25,000个APC。将27.4pM至20nM的抗体的3倍连续稀释液添加到含50μL测定培养基的板中。将细胞混合物在37℃、5%CO₂的加湿孵育箱中孵育5小时。根据制造商说明书,使用Promega One-Glo(目录号E6130)和Perkin Elmer Envision读板器测定NF-κB荧光素酶活性。使用四参数逻辑方程在8点剂量应答曲线(GraphPad Prism)上生成相对荧光素酶单位(RLU)并确定EC50值。每个剂量应答曲线的零一抗条件(单独的二抗)也包含在分析中,作为三倍连续稀释的延续,并且表示为最低剂量。通过取曲线上最高RLU与最低RLU的比率来确定最大活性,并且将其表示为信号:噪声(S:N)。EC50值和S/N汇总于表8中。关于表8,ND对应于由于结合在所测抗体浓度范围内未达到饱和而无法准确测定的EC50值。

[0284] 表8:MAGE-A4×CD3双特异性抗体在

[0285] Jurkat/NF-κB-Luc/APC报告基因生物测定中的活性

抗体			Jurkat/NF-κB Luc cl.1C22 + IM-9		Jurkat/NF-κB Luc cl.1C22 + U266		Jurkat/NF-κB Luc cl.1C22 + RAJI	
	VH1	VH2	EC50 (nM)	倍数活化	EC50 (nM)	倍数活化	EC50 (nM)	倍数活化
[0286] bsAb6043	mAb31339N2	mAb7221G	N.D.	1.8	N.D.	0.9	N.D.	0.8
bsAb6054	mAb31339N2	mAb7195P	7.40E-10	41.9	3.10E-09	6.3	N.D.	0.9
bsAb4241	mAb8767P2	mAb7221G	N.D.	1.1	N.D.	1.1	N.D.	0.9
bsAb3905	mAb17363N	mAb7195P	N.D.	2.2	N.D.	1.2	N.D.	0.9

[0287] 如实施例1中所述,bsAb6054抗体包括包含SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR的MAGE-A4结合臂和包含SEQ ID NO:73/10的HCVR/LCVR的CD3结合臂,并且bsAb6043抗体包括包含SEQ ID NO:2/10的HCVR/LCVR的MAGE-A4结合臂和包含SEQ ID NO:55/10的HCVR/LCVR的CD3结合臂。bsAb4241和bsAb3905抗体是具有抗CD3结合臂的非结合(针对MAGE-A4)对照,这些结合臂分别包含与bsAb6043和bsAb6054相同的抗CD3 HCVR,所述HCVR与来自每个相应抗体的非MAGE-A4结合臂的同源轻链可变区配对。

[0288] 如表8所示,在IM9、U266B1或RAJI细胞存在下,MAGE-A4×CD3中等亲和力双特异性抗体(bsAb6043)在Jurkat/NF-κBLuc生物测定中没有活性。相反,MAGE-A4×CD3高亲和力双特异性抗体(bsAb6054)在IM9和U266B1细胞上分别具有7.4E-10M和3.1E-09M的EC50值以及41.9和6.3的S/N值。具有中等亲和力CD3臂(mAb4241)或高亲和力CD3臂(mAb3905)的非结合对照双特异性抗体具有最小的活性,S/N值≤2.2。另外,没有任何抗体在RAJI细胞上具有活性。

[0289] 进行了类似的生物测定,但这次加入了恒定量的抗CD28抗体。在此,CD28的添加部分地阻断了bsAb6054在IM9细胞上的活性(EC50为2.1E09M,S/N为28.7),同时略微增加了在U266B1细胞上的活性(EC50为6.1E-09M,S/N为8.6)。这可能归因于在这些细胞系上内源性

表达的CD80和CD86共刺激分子的水平。IM9内源地具有高水平的CD80和CD86。因此,在生物测定中添加CD28抗体阻断了Jurkat细胞上CD28与其配体CD80和CD86的天然相互作用,因此降低了活性。U266B1具有低水平的CD80和CD86。在此,CD28的添加刺激Jurkat细胞上的CD28信号传导,从而增加了活性(表9)。

[0290] 表9:MAGE-A4×CD3双特异性抗体与2nM mAb5705(抗CD28抗体)的组合在Jurkat/NF-κB-Luc/APC报告基因生物测定中的活性

抗体	VH1	VH2	Jurkat/NF-κB Luc cl.1C11 + IM-9		Jurkat/NF-κB Luc cl.1C11 + U266	
			EC50 (nM)	倍数活 化	EC50 (nM)	倍数活 化
bsAb6043 + 2nM mAb5705 (CD28)	mAb31339N2	mAb7221G	N.D.	1.1	N.D.	0.9
bsAb6054 + 2nM mAb5705 (CD28)	mAb31339N2	mAb7195P	2.10E-09	28.7	6.10E-09	8.6
mAb4241 + 2nM mAb5705 (CD28)	mAb8767P2	mAb7221G	N.D.	0.7	N.D.	1.3
mAb3905 + 2nM mAb5705 (CD28)	mAb17363N	mAb7195P	N.D.	0.7	N.D.	1

[0291]

[0292] 除了上文结合表8讨论的抗体之外,mAb5705是包含SEQ ID NO:85的HCVR和SEQ ID NO:93的LCVR的抗CD28抗体。

[0293] 实施例5:Jurkat/NF-κB-Luc/APC报告基因生物测定中的肽特异性

[0294] 还利用了工程化T细胞/APC功能性Jurkat/NF-κBLuc报告基因/APC生物测定来评估MAGE-A4×CD3双特异性抗体是否保留了对MAGE-A4肽的选择性(相对于表7中鉴定的相关肽)。在该测定中,如前所述,用靶肽MAGE-A4 286-294或序列相关的脱靶肽(表7)对T2细胞进行脉冲。如表10中汇总的,当与用MAGE-A4 286-294肽脉冲的T2细胞一起孵育时,bsAb6043(MAGE-A4×CD3中等亲和力)双特异性抗体和bsAb6054(MAGE-A4×CD3高亲和力)双特异性抗体两者均刺激NF-κB-依赖性报告基因活性。当与用脱靶肽AOX1 795-803和SHTN1 198-206脉冲的T2细胞一起孵育时,也检测到活性。总之,对于MAGE-A4 293-294、AOX1 795-803和SHTN1 198-206肽,bsAb6043分别以3.0E-10M、3.3E-10M和3.5E-09M的EC50值以及75.2、40.4和75.3的S/N值刺激报告基因活性。对于MAGE-A4 286-294、AOX1 795-803和SHTN1 198-206肽,bsAb6054分别以2.0E-12M、2.1E-11M和1.3E-09M的EC50值以及78.7、36和81.1的S/N值刺激报告基因活性。具有中等亲和力CD3臂(mAb4241)或高亲和力CD3臂(mAb3905)的非结合对照双特异性抗体具有最小的活性,S/N值≤2.9。

[0295] 表10:针对MAGE-A4和相关肽的MAGE-A4×CD3双特异性抗体在Jurkat/NF-κB-Luc/T2脉冲报告基因生物测定中的活性

细胞系	bsAb6043		bsAb6054		mAb4241		mAb3905	
	EC50 (M)	倍数变化	EC50 (M)	倍数变化	EC50 (M)	倍数变化	EC50 (M)	倍数变化
T2 脉冲 MAGE-A4 286-294	3.00E-10	75.3	2.00E-12	78.7	>20nM	1.9	>20nM	1
T2 脉冲 FN1 2182-2190	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1.6	>2.0E-08	1
T2 脉冲 AOX1 795-803	3.30E-10	40.4	2.10E-11	36	>20nM	1	>20nM	1
T2 脉冲 PSME2 145-153	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1.4	>2.0E-08	1
T2 脉冲 PCDHGC3 337-345	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1.8	>2.0E-08	1
T2 脉冲 SHTN1 198-206	3.50E-09	75.3	1.30E-09	81.1	>20nM	1.9	>20nM	1
T2 脉冲 SMIM11A 4-12	>2.0E-08	1.2	>2.0E-08	1	>2.0E-08	2.2	>2.0E-08	1
T2 脉冲 RABGAP1L 408-416	>2.0E-08	1.1	>2.0E-08	1	>2.0E-08	2.1	>2.0E-08	1
T2 脉冲 CNOT1 1965-1973	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1	>2.0E-08	2.9	>2.0E-08	1
T2 脉冲 MRPL37 334-342	>2.0E-08	1.2	>2.0E-08	2.4	>2.0E-08	1.1	>2.0E-08	1
T2 脉冲 CARD8 170-178	>2.0E-08	1.8	>2.0E-08	1.2	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1
T2 脉冲 PLEKHH2 790-798	>2.0E-08	1.9	>2.0E-08	2.8	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1
T2 脉冲 NBAS 2063-2071	>2.0E-08	1.6	>2.0E-08	1.3	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1
T2 脉冲 TEP1 2156-2164	>2.0E-08	1.9	>2.0E-08	1.2	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1
T2 脉冲 HEATR5A 1925-1933	>2.0E-08	2.1	>2.0E-08	1.2	>2.0E-08	1	>2.0E-08	1
T2 未脉冲	>2.0E-08	1.5	>2.0E-08	1.2	>2.0E-08	1.1	>2.0E-08	1

[0296]

[0297]

[0298] 实施例6:基于图像的原代杀伤测定

[0299] 为了评估MAGE-A4×CD3双特异性抗体重定向针对癌细胞的T细胞应答的能力,进行了基于成像的多重原代T细胞杀伤测定。简而言之,按照制造商的方案,使用磁珠分离(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec)目录号130-045-201)从人外周血单核细胞(PBMC)中分离CD8+T细胞,并按照制造商说明书用CellTrace™Violet(赛默飞世尔科技公司C34557)对MAGE-A4 286-294抗原呈递HLA-A*02:01阳性IM9细胞系进行预标记。在96孔成像板(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)目录号6055308)中将IM9多发性骨髓瘤细胞(10,000个)与CD8+T细胞(25,000个)在100μL刺激培养基(X Vivo 15+10%FBS+1%HEPES+1%NaPyr+1%NEAA+0.01mM BME)中混合。将20nM至27.4pM范围内的抗体的三倍连续稀释液添加到另外100μL刺激培养基中的细胞中。孵育72小时后,取出50μL上清液用于细胞因子释放测定(见下文),并向细胞中添加15μL的核染料DRAQ5(赛默飞世尔科技公司目录号62252)的1:1000稀释液(稀释于PBS中)。在Opera Phenix(珀金埃尔默公司)上收集DRAQ5标记的细胞核和Cell-Trace violet标记的APC的图像,并使用Harmony分析软件(珀金埃尔默公司)计算所有条件下存活的IM9细胞(被CellTrace™Violet和DRAQ5同时标记的细胞群)的数目。不能通过所得非S形曲线产生EC50值,因此报告了6.6nM剂量(非结合对照无活性时的最高测试剂量)下的IM9细胞存活百分比%(相对于无抗体条件进行归一化)。如表11中汇总的,bsAb6043(MAGE-A4×CD3(7221G)中等亲和力双特异性抗体)对IM9细胞群存活百分比%没有积极影响,但bsAb6054(MAGE-A4×CD3高亲和力双特异性抗体)使IM9细胞群减少至38%。2nM的抗-CD28激动性抗体的添加使存活细胞的数量加倍(80%)(表9)。这可归因于mAb5705阻断CD28从而抑制其与IM9细胞上内源表达的CD80和CD86相互作用的能力。非结合对照×CD3双特异性抗体mAb4241(中等CD亲和力)和mAb3905(高CD3亲和力)在测定中没有活性。

[0300] 表11:基于T细胞细胞毒性图像的测定

处理条件	6.6nM 下的存活率%			
	bsAb6043	bsAb6054	mAb4241	mAb3905
[0301] 单独的抗体	91	38	99	109
抗体+ mAb5705 (CD28) 2nM	109	80	103	137

[0302] 实施例7:重要细胞因子释放测定

[0303] 还在从上述基于成像的杀伤测定中利用的6.6nM处理剂量取样的细胞培养物上清液中对IL2和IFN-γ释放进行了评估。根据制造商说明书,通过AlphaLisa(珀金埃尔默公司目录号AL221F、AL217F)测定细胞因子水平,并将RLU值相对于未处理的孔进行归一化以确定S/N值。如表12中汇总的,bsAb6043(MAGE-A4×CD3(7221G)中等亲和力双特异性抗体)不释放任何IL2或IFN-γ,而更高亲和力的MAGE-A4×CD3双特异性抗体bsAb6054诱导了适度的IL2和IFN-γ的产生,其中S/N值分别为2.1和2.4。CD28抗体(mAb5705)的添加没有显著影响细胞因子的产生(表12)。

[0304] 表12:三天杀伤测定中IL2和IFN-γ的释放

	bsAb6043		bsAb6054		mAb4241		mAb3905	
	IL2	IFN- γ	IL2	IFN- γ	IL2	IFN- γ	IL2	IFN- γ
[0305] 单独的抗体	1.2	0.9	2.1	2.4	0.7	0.7	0.6	0.9
抗体+ mAb5705 (CD28) 2nM	0.8	0.8	2	1.8	0.8	0.8	1	1.1

[0306] 实施例8: MAGE-A4特异性嵌合抗原受体的生成

[0307] 使用分别对应于SEQ ID NO:1和9的抗MAGE-A4抗体的HCVR和LCVR核苷酸序列将表1的抗MAGE-A4 31339N2抗体重新格式化为VL-VH单链可变片段(ScFv)并置于使用了CD8 α 铰链和跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 刺激结构域或CD28铰链、跨膜和信号传导结构域的嵌合抗原受体(CAR)构建体中。对应的抗MAGE-A4抗体(mAbH31339N2)的全长核酸和多肽重链序列分别对应于SEQ ID NO:17和18。对应的抗MAGE-A4抗体(mAbH31339N2)的全长核酸和多肽轻链序列分别对应于SEQ ID NO:19和20。全长核酸和多肽HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄靶向CAR序列分别对应于SEQ ID NO:21和22。作为非结合对照,使用不相关的scFv的核苷酸序列设计了类似的CAR。根据制造商方案,将MAGE-A4特异性CAR克隆到慢病毒表达载体(Lenti-X™双顺反子表达系统(Neo),克隆技术公司(Clontech)目录号632181)中,并且通过Lenti-X包装单发(VSV-G)系统(克隆技术公司目录号631276)生成慢病毒颗粒。然后根据制造商的方案,使用RetroNectin®预涂覆皿(克隆技术公司目录号T110a)用CAR构建体转导被工程化为表达NFkB-荧光素酶报告基因(Jurkat/NKFBLuc c1 1C11)的Jurkat细胞。在500 μ g/mL的G418(吉博公司目录号11811-098)中选择至少2周后,生成了以下CAR T细胞系; Jurkat/NKFBLuc c1 1C11/MAGE-A4(286-294)31339VL-VH CART。作为非结合对照,使用不相关的scFv的核苷酸序列设计了类似的CAR。评价了此CAR T细胞系响应表达MAGE-A4的细胞的细胞表面表达和功能活性。

[0308] 实施例9: MAGE-A4 CAR构建体在Jurkat细胞中的细胞表面表达以及MAGE-A4 CAR T细胞的活化

[0309] 通过流式细胞术评估Jurkat/NF- κ B-Luc细胞中MAGE-A4 CAR构建体的细胞表面表达的相对水平。为了染色,将细胞在不含钙和镁的PBS(Irving 9240)和2%BSA(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)目录号A8577)的染色缓冲液中以每孔200,000个细胞的密度接种于96孔V底板中,并且用10 μ g/mL的蛋白L(Genscript Biotin Protein L,目录号M00097)在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。孵育后,将细胞在染色缓冲液中洗涤一次,并用0.5 μ g/mL的链霉亲和素Alexa-647二抗(Biolegend,目录号405237)在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。最后,将细胞用浓度为1:1000的绿色荧光活力染料(分子探针公司,目录号L-34970,重构于50 μ L DMSO中)染色。然后将细胞用稀释于PBS中的50%BD Cytifix(BD公司(Becton Dickinson),目录号554655)溶液洗涤并固定。对活细胞进行门控之后将样品在Intellicyt iQue流式细胞仪上运行,并且通过FlowJo 10.2进行分析以计算平均荧光强度(MFI)。通过取蛋白L阳性细胞的数量并除以细胞总数来计算蛋白L阳性细胞的百分比。表13显示, Jurkat/NF- κ B-Luc/MAGE-A4 31339N2 VL-VHCAR-T细胞系的CAR阳性率为33.8%,如通过蛋白L染色百分比所测量的。非靶向对照CAR在67.2%的细胞中有所表达。

[0310] 在CAR T/APC(抗原呈递细胞)生物测定中评估了CAR T细胞系的活性。为了进行生

物测定,将50,000个CAR T细胞添加到混合于50 μ L测定培养基(含10%FBS和1%P/S/G的RPMI培养基)中并添加到Thermo-Nunc 96孔白板(赛默飞世尔科技公司,目录号136101)中,然后添加混合于50 μ L测定培养基中的APC(500,000个细胞至685个细胞)的3倍连续稀释液。利用了以下APC:IM9(其内源性表达MAGE-A4 286-294肽并且为HLA-A*02:01阳性)和HEK293(其为MAGE-A4 286-294阴性并为HLA-A*02:01阳性)。将细胞混合物在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的加湿孵育箱中孵育5小时。使用Promega One-Glo(目录号E6130)和Perkin Elmer Envision读板器测定NF- κ B荧光素酶活性。在GraphPad Prism中使用四参数逻辑方程在8点剂量应答曲线上生成并绘制相对荧光素酶单位(RLU),以生成EC50值(APC的数量)。每个剂量应答曲线的零APC条件也包含在分析中,作为三倍系列连续的延续,并且表示为最低剂量。通过取曲线上最高RLU与最低RLU的比率来确定CAR-T活性并将其报告为EC50(APC的数量),并且将其在表14中表示为信号:噪声(S:N)。31339N2 CAR-T在与IM9细胞孵育时被活化,其中EC50为14,669个细胞,并且S/N为37.4,而非靶向对照CAR-T仅被活化4.9倍。在HEK293细胞(其为MAGE-A4阴性但为HLA-A2阳性)上未观察到活化。

[0311] 表13:Jurkat/NFKBLuc cl 1C11细胞中CAR的蛋白L染色

	细胞系	蛋白 L 阳性率%
	Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11	3.9
[0312]	Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11/ MAGE-A4 (286-294) 31339N2 VL-VH CAR T 细胞	33.8
	Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11/对照 VL-VH CAR T 细胞	67.2

[0313] 表14:CAR T细胞/APC生物测定中MAGE-A4 CAR T细胞的活化

CAR 细胞系	IM9 APC		HEK293 APC	
	EC50	MAX S:N	EC50	MAX S:N
[0314] 亲本细胞	N.D.	5.2	N.D.	1
31339N2	14,669	37.4	N.D.	0.9
对照 CAR	N.D.	4.9	N.D.	0.8

[0315] 实施例10:通过流式细胞术测定抗HLA-A2:MAGE-A4 230-239抗体与用MAGE-A4 230-239和相关脱靶肽脉冲的T2细胞的结合

[0316] 在基于流式细胞术的肽脉冲测定中评估抗HLA-A2:MAGE-A4 230-239抗体(mAbM34852N)与HLA-A*02:01阳性T2(174CEM.T2)细胞的细胞表面结合。为了脉冲,在37 $^{\circ}$ C下将1 \times 10⁶个T2细胞与10 μ g/mL的人(h)B2M(EMD密理博公司目录号475828)和100 μ g/mL的MAGE-A4 230-239肽在1mL AIM V培养基(吉博公司目录号31035-025)中一起孵育16小时。将细胞在染色缓冲液(不含钙和镁的PBS(Irvine Scientific目录号9319)+2%FBS(Seradigm,批号238B15)中洗涤,用细胞分离缓冲液(密理博公司,目录号S-004-C)收集,并重悬于染色缓冲液中。将经脉冲的细胞(200,000个)接种在96孔V底板(爱思进公司,目录号P-96-450V-C-S)中,并用mAbM34852N或非结合对照抗体(mAb1097)的三倍连续稀释液(1.7pM至100nM)在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。然后将细胞在染色缓冲液中洗涤一次,并在4 $^{\circ}$ C下与5 μ g/mL的Alexa Fluor 647缀合的Fab'2抗小鼠Fc特异性二抗(Jackson ImmunoResearch,目录号115-606-071)一起孵育30分钟。最后,将细胞用绿色荧光活力染料(分子探针公司目录号L-34970)染色,该染料重构于浓度为1:1000的50 μ L DMSO中。然后将细胞用稀释于PBS中的50%BD Cytotfix(BD公司,目录554655)溶液洗涤并固定。在IntelliCyt iQue流式细胞仪

(Intellicyt) 上运行样品,并且使用Forecyte分析软件(Intellicyt)分析结果以计算对活细胞进行门控之后的平均荧光强度(MFI)。在Graphpad Prism中使用四参数逻辑方程在12点应答曲线上绘制MFI值,以计算EC₅₀值。每个剂量应答曲线的单独的二抗(即无一抗)也包含在分析中,作为三倍连续稀释的延续,并且表示为最低剂量。通过取剂量应答曲线上最高MFI与单独的二抗的孔中的MFI的比率来确定信噪比(S/N)。EC₅₀值(M)和最大S/N示于表15中。mAbM34852N以4.7nM的EC₅₀和243.3的最大S/N结合,而对照抗体(mAb1097)的结合仅被微弱地检测到。

[0317] 表15:抗HLA-A2:MAGE-A4(230-239)抗体与用MAGE-A4(230-239)脉冲的T2细胞的结合的流式细胞术测定结果

[0318]	mAb	EC ₅₀ (M)	最大S/N
	mAbM34852N	4.7E-09	243.3
	mAb1097(同种型对照)	ND	13.4

[0319] ND=EC50值无法精确测定,因为结合在所测抗体浓度范围内未达到饱和。

[0320] 计算机计算策略鉴定了几种预测与HLA-A*02:01形成复合物的MAGE-A4相关肽。鉴定结果汇总于表16中。在上述T2脉冲测定中在100nM的单一浓度下评估了HLA-A2:MAGE-A4 230-239抗体(mAbM34852N)和非结合同种型对照抗体(mAb1097)与这些相关肽的结合。这里的结合在表17中显示为经肽脉冲的细胞的结合除以与未脉冲的细胞的结合的MFI比率。mAbM34852N以512.9的结合比率结合MAGE-A4肽,而同种型对照mAb1097以4.3的比率结合该肽。mAbM34852N与MAGE-A8(232-241)肽具有相似的结合,其结合比率为870.2;然而,未观察到与剩余肽的可检测结合,并且对于所有测试的肽,对照抗体结合均<4.3,这表明mAbM34852N具有作为针对MAGE-A4的治疗剂的潜力。

[0321] 表16:MAGE-A4(230-239)肽和预测的脱靶肽的序列

[0322]	肽(基因名称+全长蛋白质内的位置)	肽序列	SEQ ID NO.
	MAGE-A4(230-239)	G <u>V</u> YD <u>G</u> REHTV	122
	MAGE-A8(232-241)	G <u>L</u> YD <u>G</u> REH <u>S</u> V	123
	THBS3(116-125)	G <u>L</u> A <u>D</u> GR <u>T</u> H <u>T</u> V	124
	LPIN2(823-832)	G <u>V</u> P <u>D</u> CR <u>I</u> F <u>T</u> V	125
	SCL25A19(111-120)	<u>S</u> VYD <u>A</u> RE <u>F</u> S <u>V</u>	126
	CELSR3(1594-1603)	G <u>L</u> S <u>D</u> G <u>Q</u> W <u>H</u> T <u>V</u>	127
	PAPPA2(307-316)	G <u>V</u> F <u>D</u> N <u>C</u> S <u>H</u> T <u>V</u>	128
	FAT4(4053-4062)	<u>K</u> V <u>S</u> D <u>G</u> H <u>F</u> H <u>T</u> V	129
	MAGE-A10(254-263)	G <u>L</u> YD <u>G</u> M <u>E</u> H <u>L</u> I	130
	CCDC36(417-426)	<u>F</u> L <u>C</u> D <u>P</u> R <u>E</u> H <u>L</u> V	131

[0323] 来自MAGE-A4(230-239)序列的变化带下划线。

[0324] 表17:抗HLA-A2:MAGE-A4(230-239)抗体与用相关肽脉冲的T2细胞的结合的流式细胞术测定结果

肽 (基因名称+肽位置)	抗体结合比率 (脉冲细胞 MFI/未脉冲细胞 MFI)	
	mAbM34852N	mAb1097
MAGE-A4 (230-239)	512.9	4.3
MAGE-A8 (232-241)	870.2	3.3
THBS3 (116-125)	1.0	1.0
[0325] LPIN2 (823-832)	0.9	0.9
SCL25A19 (111-120)	0.8	0.9
CELSR3 (1594-1603)	0.8	0.9
PAPPA2 (307-316)	0.9	0.9
FAT4 (4053-4062)	1.0	1.1
MAGE-A10 (254-263)	0.9	1.3
CCDC36 (417-426)	1.0	1.1

[0326] 实施例11:HLA-A2:MAGE-A4 (230-239) 丙氨酸扫描

[0327] 在基于流式细胞术的肽脉冲测定中评估抗HLA-A2:MAGE-A4 230-239抗体 (mAbM34852N) 与HLA-A*02:01阳性T2 (174CEM.T2) 细胞的细胞表面结合。为了脉冲,在37°C下将 1×10^6 个T2细胞与10 μ g/mL的人 (h) B2M (EMD密理博公司目录号475828) 和100 μ g/mL的MAGE-A4 230-239肽在1mL AIM V培养基 (吉博公司目录号31035-025) 中一起孵育16小时。将细胞在染色缓冲液 (不含钙和镁的PBS (Irvine Scientific目录号9319) +2%FBS (Seradigm,批号238B15) 中洗涤,用细胞分离缓冲液 (密理博公司,目录号S-004-C) 收集,并重悬于染色缓冲液中。将经脉冲的细胞 (200,000个) 接种在96孔V底板 (爱思进公司,目录号P-96-450V-C-S) 中,并用mAbM34852N或非结合同种型对照抗体的三倍连续稀释液 (1.7pM至100nM) 在4°C下染色30分钟。然后将细胞在染色缓冲液中洗涤一次,并在4°C下与5 μ g/mL的Alexa Fluor 647缀合的Fab'2抗小鼠Fc特异性二抗 (Jackson ImmunoResearch,目录号115-606-071) 一起孵育30分钟。最后,将细胞用绿色荧光活力染料 (分子探针公司目录号L-34970) 染色,该染料重构于浓度为1:1000的50 μ L DMSO中。然后将细胞用稀释于PBS中的50%BD Cytotfix (BD公司,目录号554655) 溶液洗涤并固定。在IntelliCyt iQue流式细胞仪 (Intellicyt) 上运行样品,并且使用Forecyte分析软件 (Intellicyt) 分析结果以计算对活细胞进行门控之后的平均荧光强度 (MFI)。在Graphpad Prism中使用四参数逻辑方程在12点应答曲线上绘制MFI值,以计算EC₅₀值。每个剂量应答曲线的单独的二抗 (即无一抗) 也包含在分析中,作为三倍连续稀释的延续,并且表示为最低剂量。通过取剂量应答曲线上最高MFI与单独的二抗的孔中的MFI的比率来确定信噪比 (S/N)。EC₅₀值 (M) 和最大S/N示于表19中。mAbM34852N以4.7nM的EC₅₀和243.3的最大S/N结合,而对照抗体的结合仅被微弱地检测到。丙氨酸扫描测定的结果显示,mAbM34852表现出对MAGE-A4 (230-239) 肽的结合。

[0328] 表18:MAGE-A4 (230-239) 肽丙氨酸扫描肽的序列

肽 (基因名称+肽位置)	肽序列	SEQ ID NO.
MAGE-A4 (230-239)	G <u>V</u> YD <u>G</u> REHTV	122
MAGE-A4 (230-239) G230A	<u>A</u> VYD <u>G</u> REHTV	132
MAGE-A4 (230-239) V231A	G <u>A</u> YD <u>G</u> REHTV	133
MAGE-A4 (230-239) Y232A	G <u>V</u> <u>A</u> D <u>G</u> REHTV	134
MAGE-A4 (230-239) D233A	G <u>V</u> Y <u>A</u> <u>G</u> REHTV	135

MAGE-A4 (230-239) G234A	GVYD <u>A</u> REHTV	136
MAGE-A4 (230-239) R235A	GVYD <u>G</u> A <u>E</u> HTV	137
MAGE-A4 (230-239) E236A	GVYD <u>G</u> R <u>A</u> HTV	138
MAGE-A4 (230-239) H237A	GVYD <u>G</u> R <u>E</u> A <u>T</u> V	139
MAGE-A4 (230-239) T238A	GVYD <u>G</u> R <u>E</u> H <u>A</u> V	140
MAGE-A4 (230-239) V239A	GVYD <u>G</u> R <u>E</u> H <u>T</u> A	141

[0330] 表19:抗HLA-A2:MAGE-A4 (230-239) 抗体与用丙氨酸扫描肽脉冲的T2细胞的结合的流式细胞术测定结果

肽 (基因名称+肽位置)	抗体结合比率 (脉冲细胞 MFI/未脉冲细胞 MFI)	
	mAbM34852N	同种型对照
MAGE-A4 (230-239)	121.3	1
MAGE-A4 (230-239) G230A	38.0	0.5
MAGE-A4 (230-239) V231A	35.5	0.5
MAGE-A4 (230-239) Y232A	1.0	0.5
MAGE-A4 (230-239) D233A	1.4	0.5
MAGE-A4 (230-239) G234A	22.9	0.5
MAGE-A4 (230-239) R235A	4.0	0.5
MAGE-A4 (230-239) E236A	42.6	0.5
MAGE-A4 (230-239) H237A	82.0	0.5
MAGE-A4 (230-239) T238A	108.6	0.5
MAGE-A4 (230-239) V239A	80.0	0.5

[0331] 序列描述

[0332] 表20:序列标识符

[0335]

SEQ ID NO.	DNA/多肽	序列
1	DNA	mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 HCVR
2	多肽	mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 HCVR
3	DNA	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 HCDR1
4	多肽	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 HCDR1
5	DNA	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 HCDR2
6	多肽	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 HCDR2
7	DNA	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 HCDR3
8	多肽	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 HCDR3
9	DNA	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 LCVR
10	多肽	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 LCVR
11	DNA	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 LCDR1
12	多肽	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 LCDR1
13	DNA	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 LCDR2; 和抗 CD3-A (mAbH7221G) LCDR2; 和抗 CD3-B (mAbH7195P) LCDR2; 和 mAbM34852N LCDR2
14	多肽	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 LCDR2; 和抗 CD3-A (mAbH7221G) LCDR2; 和抗 CD3-B (mAbH7195P) LCDR2; 和 mAbM34852N LCDR2

[0336]

15	DNA	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 Lcdr3
16	多肽	mAbM31339N、mAbM31339N2 和 mAbH31339N2 Lcdr3
17	DNA	mAbH31339N2HC
18	多肽	mAbH31339N2HC
19	DNA	mAbH31339N2LC
20	多肽	mAbH31339N2LC
21	DNA	全长 31339N2 HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ 靶向 CAR (4-1BB 共刺激结构域)
22	多肽	全长 31339N2 HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ 靶向 CAR (4-1BB 共刺激结构域)
23	多肽	(G4S) ₁ 接头
24	多肽	(G4S) ₂ 接头
25	多肽	(G4S) ₃ 接头
26	多肽	GSTSGSGKPGSGEGSTKG 接头
27	多肽	CD8 α 铰链
28	多肽	CD8 跨膜结构域
29	多肽	4-1BB 共刺激结构域
30	多肽	CD3 ζ 信号传导结构域
31	DNA	全长 MAGE-A4
32	多肽	全长 MAGE-A4
33	多肽	MAGE-A4 (286-294)
34	多肽	CD28 铰链
35	DNA	CD28 铰链
36	多肽	CD28 跨膜
37	DNA	CD28 跨膜
38	多肽	CD28 共刺激结构域
39	DNA	CD28 共刺激结构域
40	多肽	FN1 2182-2190
41	多肽	AOX1 795-803
42	多肽	PSME2 145-153
43	多肽	PCDHGC3 337-345
44	多肽	SHTN1 198-206
45	多肽	SMIM11A 4-12
46	多肽	RABGAP1L 408-416
47	多肽	CNOT1 1965-1973
48	多肽	CARD8 170-178
49	多肽	MRPL37 334-342
50	多肽	PLEKHH2 790-798
51	多肽	NBAS 2063-2071
52	多肽	TEP1 2156-2164
53	多肽	HEATR5A 1925-1933

[0337]

54	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) HCVR
55	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) HCVR
56	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) HCDR1
57	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) HCDR1
58	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) HCDR2
59	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) HCDR2
60	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) HCDR3
61	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) HCDR3
62	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) LCVR; 和 抗 CD3-B (mAbH7195P) LCVR
63	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) LCVR; 和 抗 CD3-B (mAbH7195P) LCVR
64	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) LCDR1; 和 抗 CD3-B (mAbH7195P) LCDR1
65	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) LCDR1; 和 抗 CD3-B (mAbH7195P) LCDR1
66	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) LCDR3; 和 抗 CD3-B (mAbH7195P) LCDR3
67	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) LCDR3; 和 抗 CD3-B (mAbH7195P) LCDR3
68	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) HC
69	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) HC
70	DNA	抗 CD3-A (mAbH7221G) LC; 和抗 CD3-B (mAbH7195P) LC
71	多肽	抗 CD3-A (mAbH7221G) LC; 和抗 CD3-B (mAbH7195P) LC
72	DNA	抗 CD3-B (mAbH7195P) HCVR
73	多肽	抗 CD3-B (mAbH7195P) HCVR
74	DNA	抗 CD3-B (mAbH7195P) HCDR1
75	多肽	抗 CD3-B (mAbH7195P) HCDR1
76	DNA	抗 CD3-B (mAbH7195P) HCDR2
77	多肽	抗 CD3-B (mAbH7195P) HCDR2
78	DNA	抗 CD3-B (mAbH7195P) HCDR3
79	多肽	抗 CD3-B (mAbH7195P) HCDR3
80	DNA	抗 CD3-B (mAbH7195P) HC
81	多肽	抗 CD3-B (mAbH7195P) HC
82	DNA	mAbM31339N HCVR
83	多肽	mAbM31339N HCVR
84	DNA	CD28 HCVR
85	多肽	CD28 HCVR
86	DNA	CD28 HCDR1
87	多肽	CD28 HCDR1
88	DNA	CD28 HCDR2

[0338]

89	多肽	CD28 HCDR2
90	DNA	CD28 HCDR3
91	多肽	CD28 HCDR3
92	DNA	CD28 LCVR
93	多肽	CD28 LCVR
94	DNA	CD28 LCDR1
95	多肽	CD28 LCDR1
96	DNA	CD28 LCDR2
97	多肽	CD28 LCDR2
98	DNA	CD28 LCDR3
99	多肽	CD28 LCDR3
100	DNA	CD28 HC
101	多肽	CD28 HC
102	DNA	CD28 LC
103	多肽	CD28 LC
104	DNA	全长 31339N2 HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ 靶向 CAR (CD28 共刺激结构域)
105	多肽	全长 31339N2 HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ 靶向 CAR (CD28 共刺激结构域)
106	DNA	mAbM34852N HCVR
107	多肽	mAbM34852N HCVR
108	DNA	mAbM34852N HCDR1
109	多肽	mAbM34852N HCDR1
110	DNA	mAbM34852N HCDR2
111	多肽	mAbM34852N HCDR2
112	DNA	mAbM34852N HCDR3
113	多肽	mAbM34852N HCDR3
114	DNA	mAbM34852N LCVR
115	多肽	mAbM34852N LCVR
116	DNA	mAbM34852N LCDR1
117	多肽	mAbM34852N LCDR1
118	DNA	mAbM34852N LCDR3
119	多肽	mAbM34852N LCDR3
120	多肽	全长 31339N2 HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ 靶向 CAR (4-1BB 共刺激结构域)
121	多肽	全长 31339N2 HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ 靶向 CAR (CD28 共刺激结构域)
122	多肽	MAGE-A4 (230-239)
123	多肽	MAGE-A8 (232-241)
124	多肽	THBS3 (116-125)
125	多肽	LPIN2 (823-832)
126	多肽	SCL25A19 (111-120)
127	多肽	CELSR3 (1594-1603)
128	多肽	PAPPA2 (307-316)

	129	多肽	FAT4 (4053-4062)
	130	多肽	MAGE-A10 (254-263)
	131	多肽	CCDC36 (417-426)
	132	多肽	MAGE-A4 (230-239) G230A
	133	多肽	MAGE-A4 (230-239) V231A
	134	多肽	MAGE-A4 (230-239) Y232A
[0339]	135	多肽	MAGE-A4 (230-239) D233A
	136	多肽	MAGE-A4 (230-239) G234A
	137	多肽	MAGE-A4 (230-239) R235A
	138	多肽	MAGE-A4 (230-239) E236A
	139	多肽	MAGE-A4 (230-239) H237A
	140	多肽	MAGE-A4 (230-239) T238A
	141	多肽	MAGE-A4 (230-239) V239A

[0340] 注释序列

[0341] 在以下注释序列中,这些部分通过无下划线区段和带下划线区段交替进行标识,并且这些部分的顺序对应于每个序列下面列出的顺序(即,第一个无下划线区段是VL,下一个带下划线区段是(G4S)3,下一个无下划线区段是VH,依此类推)。

[0342] MAGE-A4 (286-294) 31339N2 VL-VH BBzCAR (SEQ ID NO:22) DIQMTQSPSSLSASVGD
 VTITCRASQSIDTFLN~~WYQQKPGKVPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTVFTLTISR~~LQPEDFATYYCQQSYSIP
 PITFGQGTRVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYLTWIRQAPGKGLDWI
 AYISSSGYNIYYADSVKDRFTISRDNGKNSLFLQMNNLRAEDTAVYFCAREGVTDGMDVWGQTTVTVSSGGGGSTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYI
 FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
 GPKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0343] VL

[0344] (G4S)3

[0345] VH

[0346] G4S

[0347] CD8铰链/TM

[0348] 4-1BB共刺激结构域

[0349] CD3Z

[0350] MAGE-A4 (286-294) 31339N2 VL-VH BBzCAR (SEQ ID NO:120) DIQMTQSPSSLSASVGD
 RVTITCRASQSIDTFLN~~WYQQKPGKVPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTVFTLTISR~~LQPEDFATYYCQQSYSI
 PPITFGQGTRVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYLTWIRQAPGKGLDWI
 AYISSSGYNIYYADSVKDRFTISRDNGKNSLFLQMNNLRAEDTAVYFCAREGVTDGMDVWGQTTVTVSSGGGGSTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYI
 FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
 GPKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0351] VL

[0352] (G4S)3

[0353] VH

- [0354] G4S
- [0355] CD8铰链/TM
- [0356] 4-1BB共刺激结构域
- [0357] CD3Z
- [0358] MAGE-A4 (286-294) 31339N2 VL-VH CD28铰链/TM/cytoCD3z CAR (SEQ ID NO:105)
- [0359] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDTFLNWFYQQKPKGKVPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGT
VFTLTISRLQPEDFATYYCQQSYSIPPIITFGQGTRVEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC
AASGFTFSEYYLTWIRQAPGKGLDWIAYISSSGYNIYYADSVKDRFTISRDNKGKNSLFLQMNNLRAEDTAVYFCARE
GVTGDMDVWGQGTITVTVSSGGGGSIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGLVACYS
LLVTVAFIIFWVRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPR
- [0360] VL
- [0361] (G4S) 3
- [0362] VH
- [0363] G4S
- [0364] CD28铰链
- [0365] CD28 TM
- [0366] CD28共刺激结构域
- [0367] CD3Z
- [0368] MAGE-A4 (286-294) 31339N2 VL-VH CD28铰链/TM/cytoCD3zCAR (SEQ ID NO:121)
- [0369] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDTFLNWFYQQKPKGKVPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGT
VFTLTISRLQPEDFATYYCQQSYSIPPIITFGQGTRVEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA
ASGFTFSEYYLTWIRQAPGKGLDWIAYISSSGYNIYYADSVKDRFTISRDNKGKNSLFLQMNNLRAEDTAVYFCAREG
VTDGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGLVACYS
LLVTVAFIIFWVRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPR
- [0370] VL
- [0371] (G4S) 3
- [0372] VH
- [0373] G4S
- [0374] CD28铰链
- [0375] CD28 TM
- [0376] CD28共刺激结构域
- [0377] CD3Z
- [0378] 本发明不限于本文所描述的具体实施方案的范围。事实上,除了本文所描述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将从前面的描述中变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 抗MAGE-A4抗体和嵌合抗原受体及其用途

<130> 10901W001

<150> 63/184,183

<151> 2021-05-04

<150> 63/239,293

<151> 2021-08-31

<160> 141

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

```
cagggtgcagc  tgggtggagtc  tggggggaggc  ttggtcaagc  ctggagggtc  cctgagactc      60
tcctgtgcag  cctctggatt  caccttcagt  gaatactacc  tgacctggat  ccgccaggct      120
ccaggggaagg  ggctggactg  gattgcatac  attagtagta  gtggttacaa  tatatattac      180
gcagactctg  tgaaggaccg  attcaccatt  tccagggaca  acggcaagaa  ctcactgttt      240
ctgcaaatga  acaacctgag  agccgaagac  acggccgtct  atttttgtgc  gagagagggt      300
gtaacggacg  gtatggacgt  ctggggccaa  gggaccacgg  tcaccgtctc  ctca              354
```

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

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

50		55		60											
Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu	Phe
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
			85						90				95		
Ala	Arg	Glu	Gly	Val	Thr	Asp	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

ggattcacct tcagtgaata ctac

24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr Tyr

1 5

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

attagtagta gtggttataa tata

24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 6

Ile Ser Ser Ser Gly Tyr Asn Ile

1 5

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 7

gcgagagagg gtgtaacgga cggatatggac gtc

33

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 8

Ala Arg Glu Gly Val Thr Asp Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 9

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 9

gacatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc

60

atcacttgcc gggcaagtca gagcatcgac acctttttaa attggtatca gcagaagcca

120

gggaaagtcc ctaaaactcct gatctatgct gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca

180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagtt tteactetca ccatcagccg gctgcaacct

240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ttctctcgat caccttcggc

300

caagggacac gagtggagat taaa

324

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成
 <400> 10
 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 Ser Ile Asp Thr Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成
 <400> 11

cagagcatcg acaccttt

18

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成
 <400> 12

Gln Ser Ile Asp Thr Phe
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 13	
gctgcatcc	9
<210> 14	
<211> 3	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 14	
Ala Ala Ser	
1	
<210> 15	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 15	
caacagagtt acagtattcc tccgatcacc	30
<210> 16	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 16	
Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Pro Ile Thr	
1 5 10	
<210> 17	
<211> 1335	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 17	
caggtgcagc tggaggagtc tgggggagge ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc	60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt gaactacc tgacctgat cgcaggct	120
ccagggaagg ggctggactg gattgcatac attagtagta gtggttacaa tatatattac	180
gcagactctg tgaaggaccg attcaccatt tccagggaca acggcaagaa ctactgttt	240

ctgcaaatga acaacctgag agccgaagac acggccgtct atttttgtgc gagagagggt 300
 gtaacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcggctct ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccatcagt cttcctgttc 720
 cccccaaaac ccaaggacac tctcatgata tcccggacc ctgaggtcac gtgcgtgggtg 780
 gtggacgtga gccaggaaga ccccagggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 840
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 900
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtaca gtgcaaggtc 960
 tccaacaaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020
 cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
 agcctgacct gcctggtaaa aggettctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc 1200
 ttcttctct acagcaggt caccgtggac aagagcaggt ggcaggagg gaatgtcttc 1260
 tcatgctccg tgatgatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagtc cctctccctg 1320
 tctctgggta aatga 1335

<210> 18

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 18

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

	100					105					110					
	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
	115					120					125					
	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130					135					140					
	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
	145					150					155					160
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
	165					170					175					
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
	180					185					190					
	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
	195					200					205					
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
	210					215					220					
	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
	225					230					235					240
	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
	245					250					255					
	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe
	260					265					270					
	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
	275					280					285					
	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
	290					295					300					
	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
	305					310					315					320
	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
	325					330					335					
	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln
	340					345					350					
	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
	355					360					365					
	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
	370					375					380					
	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
	385					390					395					400
	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu
	405					410					415					

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 19

<211> 648

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 19

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgcc gggcaagtca gagcatcgac acctttttaa attggtatca gcagaagcca 120
 gggaaagtcc ctaaactcct gatctatgct gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagtt ttcactctca ccatcagccg gctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ttcttccgat caccttcggc 300
 caagggacac gagggggat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
 ggccctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 20

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 20

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

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

<210> 21

<211> 1413

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 21

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcatcgac accttttaa attggtatca gcagaagcca 120
 gggaaagtcc ctaaactcct gatctatgct gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagtt ttcactetca ccatcagccg gctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ttctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gagtggagat taaacgaggt ggaggcggtg gtggcggagg cggaagtgg 360
 ggaggaggct cacagtgca gctggtggag tctgggggag gcttgggtcaa gcctggagg 420
 tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcacttca gtgaatacta cctgacctgg 480
 atccgccagg ctccagggaa ggggetggac tggattgcat acattagtag tagtggttac 540
 aatataatatt acgcagactc tgtgaaggac cgattacca tttccaggga caacggcaag 600
 aactcaactgt ttctgcaaat gaacaacctg agagccgaag acacggcctg ctatttttgt 660
 gcgagagagg gtgtaacgga cggtatggac gtctggggcc aaggaccac ggtcacctgc 720
 tcctcaggag gtggtggaag tactaccact cctgctcccc gcccccaac acctgctcca 780
 actattgcat cccaaccact ctccctcaga cccgaagctt gtcgccccgc cgccggaggt 840

gctgttcaca ctagaggact cgatthttgct tgcgacattt atatctgggc cccacttgca 900
 ggtacttgcg gagtattgct gctctcactt gttattactc tttattgcaa acggggcaga 960
 aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag 1020
 gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 1080
 aagttcagca ggagcgcaga cgccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac 1140
 gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgthtttg acaagagacg tggccgggac 1200
 cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg 1260
 cagaaagata agatggcgga ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg 1320
 ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt ctacgtacag ccaccaagga cacctacgac 1380
 gcccttcaca tgcaggcctt gccccctcgc taa 1413

<210> 22

<211> 470

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 22

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

Ser Ser Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly
 210 215 220
 Val Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 245 250 255
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 260 265 270
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 275 280 285
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 290 295 300
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 325 330 335
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 340 345 350
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 355 360 365
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 370 375 380
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 385 390 395 400
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 405 410 415
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 420 425 430
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 435 440 445
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 <210> 23

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 23
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 24
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 25
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 26
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly
<210> 27
<211> 45
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 27

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

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 28

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

<210> 29

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 29

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> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 30

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

<210> 31

<211> 1724

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 31

agagacaagc	gagcttctgc	gtctgactcg	cagcttgaga	ctggcggagg	gaagcccgcc	60
caggctctat	aaggagacaa	ggttctgagc	agacaggcca	accggaggac	aggattccct	120
ggaggccaca	gaggagcacc	aaggagaaga	tctgcctgtg	ggtccccatt	gcccagcttt	180
tgcttgcact	cttgctgct	gccctgacca	gagtcacat	gtcttctgag	cagaagagtc	240
agcactgcaa	gcctgaggaa	ggcgttgagg	ccaagaaga	ggcctgggc	ctggtgggtg	300
cacaggctcc	tactactgag	gagcaggagg	ctgctgtctc	ctctcctct	cctctggtcc	360
ctggcaccct	ggaggaagtg	cctgctgctg	agtcagcagg	tcctccccag	agtcctcagg	420
gagcctctgc	cttaccact	accatcagct	tcacttctg	gaggcaacc	aatgagggtt	480
ccagcagcca	agaagaggag	gggccaagca	cctcgctga	cgcagagtcc	ttgttccgag	540
aagcactcag	taacaaggtg	gatgagttgg	ctcattttct	gctccgcaag	tatcgagcca	600
aggagctgg	cacaaaggca	gaaatgctgg	agagagtcat	caaaaattac	aagcgtgct	660
ttcctgtgat	cttcggcaaa	gcctccgagt	cctgaagat	gatctttggc	attgacgtga	720
aggaagtgga	ccccgccagc	aacacctaca	cccttgctac	ctgcctgggc	ctttcctatg	780
atggcctgct	gggtaataat	cagatctttc	ccaagacagg	ccttctgata	atcgtctctgg	840
gcacaattgc	aatggagggc	gacagcgct	ctgaggagga	aatctgggag	gagctgggtg	900
tgatgggggt	gtatgatggg	agggagcaca	ctgtctatgg	ggagcccagg	aaactgctca	960

cccaagattg ggtgcaggaa aactacctgg agtaccggca ggtaccggc agtaatcctg 1020
 cgcgctatga gttcctgtgg ggtccaaggg ctctggctga aaccagctat gtgaaagtcc 1080
 tggagcatgt ggtcagggtc aatgcaagag ttgcattgc ctacccatcc ctgcgtgaag 1140
 cagctttgtt agaggaggaa gagggagtct gagcatgagt tgcagccagg gctgtgggga 1200
 aggggcaggg ctgggccagt gcatctaaca gcctgtgca gcagcttccc ttgcctcgtg 1260
 taacatgagg cccattcttc actctgtttg aagaaaatag tcagtgttct tagtagtggg 1320
 tttctatttt gttggatgac ttggagattt atctctgttt ctttttaca ttgttgaaat 1380
 gttcctttta atggatggtt gaattaactt cagcatccaa gtttatgaat cgtagttaac 1440
 gtatatgtct gttaatatag tttaggagta agagtcttgt tttttattca gattgggaaa 1500
 tccgttctat tttgtgaatt tgggacataa taacagcagt ggagtaagta tttagaagtg 1560
 tgaattcacc gtgaaatagg tgagataaat taaaagatac ttaattcccg ccttatgcct 1620
 cagtctattc tgtaaaattt aaaaaatata tatgcatacc tggatttctt tggcttcgtg 1680
 aatgtaagag aaattaaatc tgaataaata attctttctg ttaa 1724

<210> 32

<211> 317

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 32

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

145	150	155	160
Met Ile Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr			
	165	170	175
Tyr Thr Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly			
	180	185	190
Asn Asn Gln Ile Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Gly			
	195	200	205
Thr Ile Ala Met Glu Gly Asp Ser Ala Ser Glu Glu Glu Ile Trp Glu			
	210	215	220
Glu Leu Gly Val Met Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val Tyr			
225	230	235	240
Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Trp Val Gln Glu Asn Tyr			
	245	250	255
Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asn Pro Ala Arg Tyr Glu Phe			
	260	265	270
Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu			
	275	280	285
Glu His Val Val Arg Val Asn Ala Arg Val Arg Ile Ala Tyr Pro Ser			
	290	295	300
Leu Arg Glu Ala Ala Leu Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val			
305	310	315	
<210> 33			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 33			
Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val			
1	5		
<210> 34			
<211> 39			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 34			
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		
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro	30		
35			
<210> 35			
<211> 117			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 35			
atcgaagtga tgtacccccc tccatatctg gataacgaga agagcaatgg cacaatcatc	60		
cacgtgaagg gcaagcacct gtgcccttet ccaactgttec cggccctag caagccc	117		
<210> 36			
<211> 27			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 36			
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> 37			
<211> 81			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 37			
ttttgggtgc tgggtggtggt gggaggcgtg ctggcctggt actcctgct ggtgaccgtg	60		
gccttcatca tcttttgggt g	81		
<210> 38			
<211> 41			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			

<400> 38

```
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> 39

<211> 123

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 39

```
agaagcaaga gatccagget gctgcactct gactatatga atatgacccc taggcgccc    60
ggccccacaa gaaagcacta ccagccatat gcaccaccta gggacttcgc agcataccgc    120
agc                                         123
```

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 40

```
Lys Val Arg Glu Glu Val Val Thr Val
1           5
```

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 41

```
Lys Val Met Cys His Val Arg Arg Val
1           5
```

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
 <223> 合成
 <400> 42
 Lys Val Leu Glu Arg Val Asn Ala Val
 1 5
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 43
 Lys Val Leu Val Glu Val Val Asp Val
 1 5
 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 44
 Lys Val Leu Glu Lys Cys Asn Arg Val
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 45
 Lys Val Leu Glu His Val Pro Leu Leu
 1 5
 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 46

Phe Leu Leu Glu Thr Val Val Arg Val

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 47

Lys Val Leu Gly Ile Val Val Gly Val

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 48

Met Val Leu Glu His Pro Ala Arg Val

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 49

Lys Val Leu Glu Gln Pro Val Val Val

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 50

Lys Val Leu Gln Asn Val Leu Arg Val

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 51

Lys Val Leu Glu Gly Val Val Ala Ala

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 52

Ala Val Glu Glu His Val Val Ser Val

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 53

Lys Val Leu Glu Thr Leu Val Thr Val

1 5

<210> 54

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 54

gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60

agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120

cctggtaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag caaggatac 180

gccgacagcg tgaaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240

cttcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc 300

agtggttatg gcaagtttta tcattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360

acagtgagta gc 372

<210> 55
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 55

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

<210> 56
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 56

gggtttacat tcgacgatta cage 24

<210> 57
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 57

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser

1 5

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 58

atatcatgga actcaggaag caag

24

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 59

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Lys

1 5

<210> 60

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 60

gcaaaatacg gcagtggta tggcaagttt tatcattatg gactggacgt g

51

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 61

Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp

1 5 10 15

Val

<210> 62

<211> 324

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 62
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 63

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 63

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

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 64

cagagcatta gcagctat	18
<210> 65	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 65	
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	
1 5	
<210> 66	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 66	
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc	30
<210> 67	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 67	
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr	
1 5 10	
<210> 68	
<211> 1353	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 68	
gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg	60
agttgcgcag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct	120
cctggtaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag caagggatac	180
gccgacagcg tgaaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac	240
cttcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcgc aaaatacggc	300

```

agtggttatg gcaagtttta tcattatgga ctggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg      360
acagtgagta gcgccagcac aaaaggtcct agegtttttc cacttgcccc atgttcaagg      420
tcaacctccg aaagtaccgc cgctcttggc tgtctcgtaa aagattatth tcccgaacct      480
gtaactgtct cctggaactc cggcgcactc acttccggcg tacatacctt ccccgctgtc      540
ctccaatctt ccggtctcta ctccctgtct tctgttgta ctgttccatc atcctcactc      600
ggcacaaaaa catatacctg caacgttgat cacaagccaa gtaataccaa agttgataag      660
cgcgctgaat ccaaatacgg tccccctgc ccccatgtc ccgctccacc tgtggctggt      720
ccctctgttt tcctttttcc ccttaaacc aaagataccc tcatgatttc cagaaccccc      780
gaggtcacct gcgctcgtct tgatgtaagc caagaagatc ccgaagtcca gttcaattgg      840
tatgtagacg gtgttgaagt ccataatgca aaacaaaaac ccagagagga acagtttaat      900
tcaacctatc gtgtcgttag cgtactcacc gttcttcate aagactggct caatggaaaa      960
gaatataaat gtaaagttag caacaaaggt ctgcccagtt caatcgaaaa aacaattagc     1020
aaagccaaaag gccaacctcg cgaaccccaa gtctatacct tgcccccttc tcaggaagaa     1080
atgaccaaaa accaagtttc actcacatgc ctcgtaaaag gattctatcc atcagacatt     1140
gcagtagaat gggaatctaa cggccaacct gaaaataatt acaaaaccac tcctcctgtc     1200
ctcgattctg acggtctttt tttcctttac tccagattga ctgttgataa atcccgtgg     1260
caggaaggta acgttttttc ttgttctgtg atgcacgaag ccctccataa cagattcact     1320
caaaaatctc tttctctctc ccctggcaaa taa                                     1353

```

<210> 69

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 69

```

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

```


Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr	Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115	120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu	
130	135 140
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro	
145	150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr	
165	170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val	
180	185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn	
195	200 205
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser	
210	215 220
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly	
225	230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	
245	250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu	
260	265 270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	
275	280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg	
290	295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	
305	310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu	
325	330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	
340	345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	
355	360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	
370	375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	
385	390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp	
405	410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	

	420		425		430	
Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro						
	435		440		445	
Gly Lys						
	450					
<210> 70						
<211> 648						
<212> DNA						
<213> 人工序列						
<220>						
<223> 合成						
<400> 70						
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc						60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca						120
gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca						180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct						240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc						300
caagggacac gactggagat taaacgaact gtggetgcac catctgtctt catcttcccg						360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc						420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc						480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg						540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag						600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag						648
<210> 71						
<211> 215						
<212> PRT						
<213> 人工序列						
<220>						
<223> 合成						
<400> 71						
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 Ser Ile Ser Ser Tyr						
20 25 30						
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile						
35 40 45						
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly						
50 55 60						
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro						

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

<210> 72

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 72

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggcaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgct gattatacca tgcactgggt cggcaagct	120
ccagggaaagg gcctggagtg ggtctcagat attagttgga atagtggtag tatagcctat	180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctctat	240
cttcaaatga acagtctgag aactgaggac acggcctttt attactgtgc aaaagatagt	300
aggggctacg gtcaactataa gtacctcggt ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc	360
accgtctcct ca	372

<210> 73

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 73

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

<210> 74

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 74

ggattcacct ttgctgatta tacc

24

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 75

Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr Thr
 1 5

<210> 76

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成
 <400> 76
 attagttgga atagtggtag tata 24
 <210> 77
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 77
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
 1 5
 <210> 78
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 78
 gcaaaagata gtaggggcta cggtcactat aagtacctcg gtttgacgt c 51
 <210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 79
 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly His Tyr Lys Tyr Leu Gly Leu Asp
 1 5 10 15
 Val
 <210> 80
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 80
 gaagtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgct gattatacca tgcaactgggt cggcaagct 120

ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcagat attagttgga atagtggtag tatagcctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctctat 240
 cttcaaatga acagtctgag aactgaggac acggcctttt attactgtgc aaaagatagt 300
 aggggctacg gtcactataa gtacctcggg ttggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct cagcctctac aaagggacct tctgtgtttc ctctggctcc ttgttctaga 420
 tctacatctg aatctacagc tgctctggga tgtctggtga aggattattt tcctgaacct 480
 gtgacagtgt cttggaattc tggagctctg acatctggag tgcatacatt tcctgctgtg 540
 ctgcagtctt ctggactgta ttctctgtct tctgtggtga cagtgccttc ttcttctctg 600
 ggaacaaaga catatacatg taatgtggat cataagcctt ctaatacaaa ggtggataag 660
 agagtggaat ctaagtatgg acctccttgt cctccttgtc ctgctcctcc tgtggctgga 720
 ccttctgtgt ttctgtttcc tctaagcct aaggatacac tgatgatctc tagaacacct 780
 gaagtgacat gtgtggtggt ggatgtgtct caggaagatc ctgaagtgca gtttaattgg 840
 tatgtggatg gagtgggaagt gcataatgct aagacaaagc ctagagaaga acagtttaat 900
 tctacatata gagtgggtgc tgtgctgaca gtgctgcatc aggattggct gaatggaaag 960
 gaatataagt gtaaggtgtc taataaggga ctgccttctt ctatcgaaaa gacaatctct 1020
 aaggctaagg gacagcctag agaacctcag gtgtatacac tgccctcttc tcaggaagaa 1080
 atgacaaaga atcaggtgtc tctgacatgt ctggtgaagg gattttatcc ttctgatatc 1140
 gctgtggaat gggaatctaa tggacagcct gaaaataatt ataagacaac acctcctgtg 1200
 ctggattctg atggatcttt ttttctgtat tctagactga cagtggataa gtctagatgg 1260
 caggaaggaa atgtgttttc ttgttctgtg atgcatgaag ctctgcataa tagatttaca 1320
 cagaagtctc tgtctctgtc tcctggaaag tag 1353

<210> 81

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 81

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

			85				90				95				
Ala	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly	Tyr	Gly	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp
			100				105				110				
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115				120				125				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu
			130				135				140				
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
			145				150				155				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
			165				170				175				
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180				185				190				
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
			195				200				205				
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser
			210				215				220				
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly
			225				230				235				
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
			245				250				255				
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu
			260				265				270				
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275				280				285				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
			290				295				300				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
			305				310				315				
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu
			325				330				335				
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
			340				345				350				
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355				360				365				
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
			370				375				380				
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
			385				390				395				

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp	
	405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	
	420 425 430
Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	
	435 440 445
Gly Lys	
	450
<210> 82	
<211> 354	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 82	
caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc	60
tctctgtcag cctctggatt caccttcagt gaatactacc tgacctgat cgcaggct	120
ccaggaagg ggctggactg gattgcatac attagtagta gtggttaca tatatattac	180
gcagactctg tgaaggaccg attcaccatt tccaggaca acggcaaca ctcactgttt	240
ctgcaaatga acaacctgag agccgaagac acggccgtct atttttgtgc gagagagggt	300
gtaacggacg gstatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca	354
<210> 83	
<211> 118	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 83	
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr	
20 25 30	
Tyr Leu Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile	
35 40 45	
Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Asn Asn Ser Leu Phe	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	

	85	90	95	
Ala Arg Glu Gly Val Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr				
	100	105	110	
Thr Val Thr Val Ser Ser				
	115			
<210> 84				
<211> 366				
<212> DNA				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 合成				
<400> 84				
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc				60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc				120
ccaggggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac cactacaac				180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagatcca gttctccctg				240
aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag atggggggtt				300
cggagggact actactacta cggtatggac gtctggggcc aaggaccac ggtcaccgtc				360
tcctca				366
<210> 85				
<211> 122				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 合成				
<400> 85				
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 Gly Ser Ile Ser Ser Tyr				
	20	25	30	
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile				
	35	40	45	
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys				
	50	55	60	
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile 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	
Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp				

	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 86			
<211> 24			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 86			
ggtggctcca tcagtagtta ctac			24
<210> 87			
<211> 8			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 87			
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr			
1 5			
<210> 88			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 88			
atctattaca gtgggatcac c			21
<210> 89			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 89			
Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr			
1 5			
<210> 90			
<211> 48			

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 90	
gcgagatggg gggttcggag ggactactac tactacggta tggacgtc	48
<210> 91	
<211> 16	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 91	
Ala Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val	
1 5 10 15	
<210> 92	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 92	
gaaatagttt tgacacagag tcccggcaca ctgtcactct ctcccgggga aagagccacc	60
ttgtcatgta gagcaagtca gtcagtctct agctcttate tcgcctggta ccagcagaag	120
ccgggacagg cccctagact gctgatctac ggggcaagtt ccagggccac cggaatcccc	180
gaccggttca gtggaagcgg aagcggaaacc gattttactt tgacgatttc tagactggag	240
ccagaggatt tcgccgttta ctattgtcaa cagtacggaa gcagcccgtg gacgtttggc	300
cagggcacga aggtagaaat caag	324
<210> 93	
<211> 108	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 93	
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 Ser 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 Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 94
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成
- <400> 94

cagtcagtct ctagctctta t

21

- <210> 95
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成
- <400> 95

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

- <210> 96
- <211> 9
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成
- <400> 96

ggggcaagt

9

- <210> 97
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>		
<223> 合成		
<400> 97		
Gly Ala Ser		
1		
<210> 98		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 98		
caacagtacg gaagcagccc gtggacg		27
<210> 99		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 99		
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr		
1	5	
<210> 100		
<211> 1347		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 100		
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc		60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc		120
ccagggaaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac cactacaac		180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagatcca gttctccctg		240
aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag atgggggggtt		300
cggaggggact actactacta cggtatggac gtctggggcc aaggaccac ggtcaccgtc		360
tcctcagcct ctacaaaggg accttctgtg tttctctctg ctctttgttc tagatctaca		420
tctgaatcta cagctgctct gggatgtctg gtgaaggatt attttctga acctgtgaca		480
gtgtcttgga attctggagc tctgacatct ggagtgcata catttctgc tgtgctgcag		540
tcttctggac tgtattctct gtcttctgtg gtgacagtgc cttcttcttc tctgggaaca		600

aagacatata catgtaatgt ggatcataag ctttctaata caaaggtgga taagagagtg 660
gaatctaagt atggacctcc ttgtcctcct tgtcctgctc ctccctgtggc tggaccttct 720
gtgtttctgt ttctcctaa gcctaaggat aactgatga tctctagaac acctgaagtg 780
acatgtgtgg tggatgatgt gtctcaggaa gatcctgaag tgcagtttaa ttggtatgtg 840
gatggagtgg aagtgcataa tgctaagaca aagcctagag aagaacagtt taattctaca 900
tatagagtgg tgtctgtgct gacagtgtg catcaggatt ggctgaatgg aaaggaatat 960
aagtgtaagg tgtctaataa gggactgcct tcttctatcg aaaagacaat ctctaaggct 1020
aagggacagc ctagagaacc tcaggtgtat aactgcctc cttctcagga agaaatgaca 1080
aagaatcagg tgtctctgac atgtctggtg aagggatttt atccttctga tatcgctgtg 1140
gaatgggaat ctaatggaca gctgaaaat aattataaga caacacctcc tgtgctggat 1200
tctgatggat cttttttct gtattctaga ctgacagtgg ataagtctag atggcaggaa 1260
ggaaatgtgt tttcttgttc tgtgatgcat gaagctctgc ataatagatt tacacagaag 1320
tctctgtctc tgtctcctgg aaagtag 1347

<210> 101

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 101

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 Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile 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
Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

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

<210> 102

<211> 648

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 102
 gaaatagttt tgacacagag tcccggcaca ctgtcactct ctcccgggga aagagccacc 60
 ttgtcatgta gagcaagtca gtcagtctct agctcttata tcgcctggta ccagcagaag 120
 ccgggacagg cccctagact gctgatctac ggggcaagtt ccagggccac cggaatcccc 180
 gaccggttca gtggaagcgg aagcggaacc gattttactt tgacgatttc tagactggag 240
 ccagaggatt tcgccgttta ctattgtcaa cagtacggaa gcagcccgtg gacgtttggc 300
 cagggcacga aggtagaaat caagcgaact gtggetgcac catctgtctt catcttcccc 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gectctgttg tgtgectgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 103

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 103

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 Ser 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 Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 104

<211> 1398

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 104

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcatcgac acctttttaa attggtatca gcagaagcca 120
 gggaaagtcc ctaaactcct gatctatgct gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagtt ttcactetca ccatcagccg gctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ttctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gagtggagat taaacgaggt ggaggcggta gtggcggagg cggaagtggt 360
 ggaggaggct cacaggtgca gctggtggag tctgggggag gcttgggtcaa gcctggaggg 420
 tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcacctca gtgaatacta cctgacctgg 480
 atccgccagg ctccagggaa ggggctggac tggattgcat acattagtag tagtggttac 540
 aatatatatt acgcagactc tgtgaaggac cgattacca tttccaggga caacggcaag 600
 aactcactgt ttctgcaaat gaacaacctg agagccgaag acacggccgt ctatTTTTgt 660
 gcgagagagg gtgtaacgga cggatggac gtctggggcc aaggaccac ggtcacctgc 720
 tcctcaggag gtggtggaag tatcgaagtg atgtaccac ccccttatct ggataacgag 780
 aagagcaatg gcacaatcat ccacgtgaag ggcaagcacc tgtgcccctc tctctgttc 840
 ccaggcccca gcaagccatt ttgggtgctg gtggtggtgg gagcgtgct ggctgttac 900
 tccctgctgg tgaccgtggc cttcatcctc ttttgggtga gatctaagcg cagccggctg 960
 ctgcaactctg actatatgaa tatgaccca cggagacctg gccaacaag aaagcactac 1020
 cagccatatg caccaccaag ggacttcgca gcctacagaa gcagggtgaa gttttccagg 1080
 tctgccgatg caccagcata ccagcaggga cagaaccagc tgtataacga gctgaatctg 1140
 ggcaggcgcg aggagtatga cgtgctggat aagaggagag gccgcgatcc tgagatggga 1200

ggcaagccaa ggcgcaagaa ccctcaggag ggcctgtaca atgagctgca gaaggacaag	1260
atggccgagg cctatagcga gatcggcatg aaggagagc ggagaagggg caaggacac	1320
gatggcctgt accagggcct gtccaccgcc acaaaggaca cctatgatgc cctgcacatg	1380
caggccctgc ctccaagg	1398
<210> 105	
<211> 466	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 105	
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 Ser Ile Asp Thr Phe	
20 25 30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Pro	
85 90 95	
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly	
100 105 110	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu	
115 120 125	
Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu	
130 135 140	
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr Tyr Leu Thr Trp	
145 150 155 160	
Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile Ala Tyr Ile Ser	
165 170 175	
Ser Ser Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe	
180 185 190	
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn	
195 200 205	
Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly	
210 215 220	

Val Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 245 250 255
 Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
 260 265 270
 His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
 275 280 285
 Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
 290 295 300
 Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
 305 310 315 320
 Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
 325 330 335
 Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
 340 345 350
 Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys
 355 360 365
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 370 375 380
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 385 390 395 400
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 405 410 415
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 420 425 430
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 435 440 445
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 450 455 460
 Pro Arg
 465
 <210> 106
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 106

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 acctgtgcag cctctggatt cacctttaga agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaact attagtggta atagtgatag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaaa attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacctc 300
 cacattacta tggttcgggg agctatcccc gccgatgttt ttgatatctg gggccaaggg 360
 acaatggtea ccgtctcttc a 381

<210> 107

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 107

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

<210> 108

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 108

ggattcacct ttagaagcta tgcc

24

<210> 109

<211> 8	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 109	
Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Ala	
1 5	
<210> 110	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 110	
attagtggta atagtgatag caca	24
<210> 111	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 111	
Ile Ser Gly Asn Ser Asp Ser Thr	
1 5	
<210> 112	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 112	
gcgaaagacc tccacattac tatggttcgg ggagctatcc ccgccgatgt ttttgatc	60
<210> 113	
<211> 20	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	

<400> 113

Ala Lys Asp Leu His Ile Thr Met Val Arg Gly Ala Ile Pro Ala Asp
 1 5 10 15
 Val Phe Asp Ile
 20

<210> 114

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 114

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc ttctatttaa attggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcacccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgagacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 115

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

<210> 116	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 116	
cagagcatta gcttctat	18
<210> 117	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 117	
Gln Ser Ile Ser Phe Tyr	
1 5	
<210> 118	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 118	
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc	30
<210> 119	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 119	
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr	
1 5 10	
<210> 120	
<211> 469	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成

<400> 120

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

290	295	300
Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys		
305	310	315
Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr		320
	325	330
Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu		335
	340	345
Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		350
	355	360
Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		365
	370	375
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		380
385	390	395
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		400
	405	410
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		415
	420	425
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln		430
	435	440
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		445
	450	455
		460
Ala Leu Pro Pro Arg		
465		
<210> 121		
<211> 465		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 121		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Phe		
	20	25
		30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40
		45
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55
		60
Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro		

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Pro			
	85	90	95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly			
	100	105	110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val			
	115	120	125
Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser			
	130	135	140
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr Tyr Leu Thr Trp Ile			
145	150	155	160
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile Ala Tyr Ile Ser Ser			
	165	170	175
Ser Gly Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr			
	180	185	190
Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn Asn			
	195	200	205
Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Val			
	210	215	220
Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser			
225	230	235	240
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu			
	245	250	255
Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His			
	260	265	270
Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val			
	275	280	285
Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr			
	290	295	300
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu			
305	310	315	320
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg			
	325	330	335
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg			
	340	345	350
Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln			
	355	360	365
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu			
	370	375	380

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

Arg

465

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 122

Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 123

Gly Leu Tyr Asp Gly Arg Glu His Ser Val

1 5 10

<210> 124

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 124

Gly Leu Ala Asp Gly Arg Thr His Thr Val

1 5 10

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 125
Gly Val Pro Asp Cys Arg Ile Phe Thr Val
1 5 10
<210> 126
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 126
Ser Val Tyr Asp Ala Arg Glu Phe Ser Val
1 5 10
<210> 127
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 127
Gly Leu Ser Asp Gly Gln Trp His Thr Val
1 5 10
<210> 128
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成
<400> 128
Gly Val Phe Asp Asn Cys Ser His Thr Val
1 5 10
<210> 129
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 129
 Lys Val Ser Asp Gly His Phe His Thr Val
 1 5 10
 <210> 130
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 130
 Gly Leu Tyr Asp Gly Met Glu His Leu Ile
 1 5 10
 <210> 131
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 131
 Phe Leu Cys Asp Pro Arg Glu His Leu Val
 1 5 10
 <210> 132
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 132
 Ala Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val
 1 5 10
 <210> 133
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成

<400> 133

Gly Ala Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 134

Gly Val Ala Asp Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 135

Gly Val Tyr Ala Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 136

Gly Val Tyr Asp Ala Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 137

Gly Val Tyr Asp Gly Ala Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 138
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 138
 Gly Val Tyr Asp Gly Arg Ala His Thr Val
 1 5 10
 <210> 139
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 139
 Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu Ala Thr Val
 1 5 10
 <210> 140
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 140
 Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Ala Val
 1 5 10
 <210> 141
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 141
 Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Ala
 1 5 10

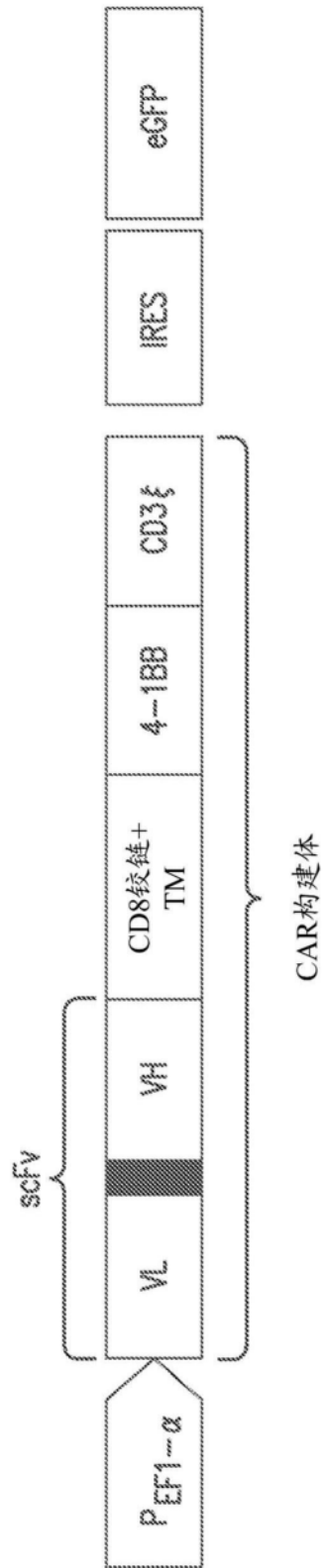


图1

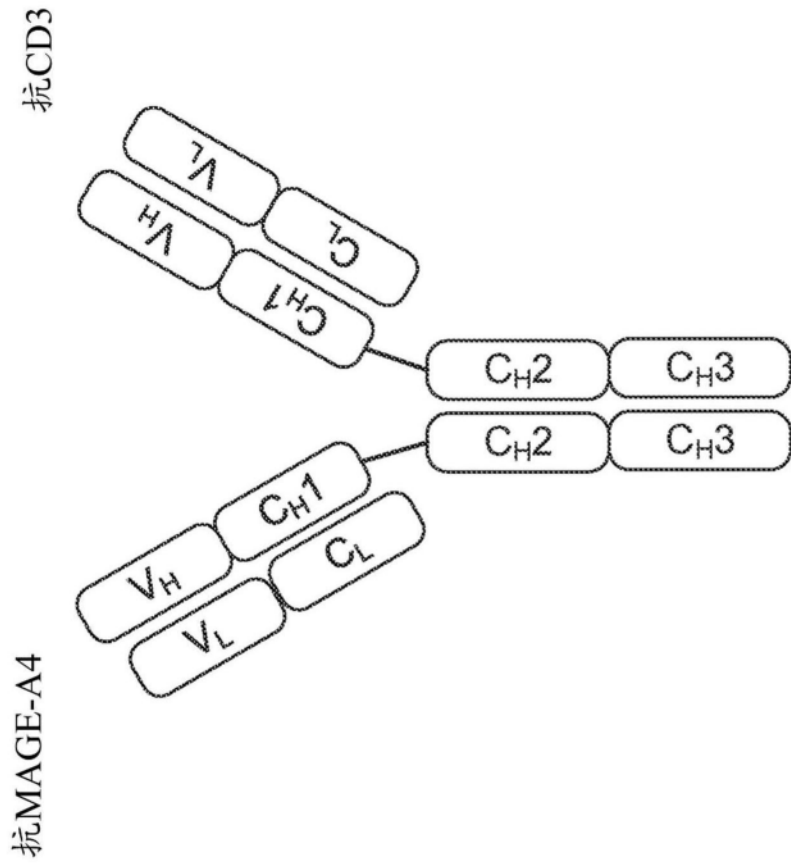


图2