



(21) 申請案號：113141076

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 10 月 18 日

(51) Int. Cl. :

*C07K16/28 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**C12N15/13 (2006.01)**C12N15/63 (2006.01)**C12N15/64 (2006.01)**C07K16/46 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2021/10/18

美國

63/256,956

(71) 申請人：美商凱特製藥公司 (美國) KITE PHARMA, INC. (US)

美國

(72) 發明人：艾凡 里卡多 AYVAR, RICARDO (MX)；馮君 FENG, JUN (CN)；格瓦拉 克勞

蒂亞 I GUEVARA, CLAUDIA I. (US)；麥拉卡蜜 喬迪 MURAKAMI, JODI

(US)；拿雅 喜巴 N NOWYHED, HEBA N. (US)；維曼 莎拉 K WYMAN,

SARAH K. (US)

(74) 代理人：陳長文；張哲倫；姚金梅

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：50 項 圖式數：3 共 321 頁

(54) 名稱

用於嵌合抗原受體之信號傳導域

(57) 摘要

揭示嵌合抗原受體(CAR)，其包含抗原結合域、跨膜域；共刺激域；及信號傳導域，其包含 CD3ε 信號傳導域、CD3γ 信號傳導域、CD3δ 信號傳導域、或 DAP12 信號傳導域中之一者。揭示一種編碼 CAR 之核酸、及包含此類核酸之重組載體。揭示一種包含此類核酸及重組載體之宿主細胞、及包含此類宿主細胞之醫藥組成物。揭示一種治療有需要之患者之疾病、或在對象中誘導免疫反應、或使對象針對癌症免疫的方法。

Disclosed are chimeric antigen receptors (CARs), comprising an antigen binding domain, a transmembrane domain; a costimulatory domain; and a signaling domain comprising one of a CD3ε signaling domain, a CD3γ signaling domain, a CD3δ signaling domain, or a DAP12 signaling domain. Disclosed is a nucleic acid encoding a CAR and recombinant vector comprising such nucleic acids. Disclosed is a host cell comprising such nucleic acids and recombinant vectors, and a pharmaceutical composition comprising such host cells. Disclosed is method of treating disease in a patient in need of thereof, or inducing an immune response in a subject or immunizing a subject against a cancer.

指定代表圖：

FMC63 scFv	—	CD28T 鉸鏈	CD28 TM	CD28 共刺激	ζ	T2A	—	CD20z CAR
FMC63 scFv	—	CD28T 鉸鏈	CD28 TM	CD28 共刺激	ε-CO	T2A	—	CD20z CAR
FMC63 scFv	—	CD28T 鉸鏈	CD28 TM	CD28 共刺激		T2A	—	CD20z CAR
FMC63 scFv	—	CD28T 鉸鏈	CD28 TM	CD28 共刺激	ε-CO (R183K)	T2A	—	CD20z CAR
FMC63 scFv	—	CD28T 鉸鏈	CD28 TM	CD28 共刺激	ε-CO (S178N/R183K)	T2A	—	CD20z CAR

【圖1】

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於嵌合抗原受體之信號傳導域

【英文發明名稱】 SIGNALING DOMAINS FOR CHIMERIC ANTIGEN

RECEPTORS

【中文】

揭示嵌合抗原受體(CAR)，其包含抗原結合域、跨膜域；共刺激域；及信號傳導域，其包含CD3 $\epsilon$ 信號傳導域、CD3 $\gamma$ 信號傳導域、CD3 $\delta$ 信號傳導域、或 DAPI2信號傳導域中之一者。揭示一種編碼CAR之核酸、及包含此類核酸之重組載體。揭示一種包含此類核酸及重組載體之宿主細胞、及包含此類宿主細胞之醫藥組成物。揭示一種治療有需要之患者之疾病、或在對象中誘導免疫反應、或使對象針對癌症免疫的方法。

【英文】

Disclosed are chimeric antigen receptors (CARs), comprising an antigen binding domain, a transmembrane domain; a costimulatory domain; and a signaling domain comprising one of a CD3 $\epsilon$  signaling domain, a CD3 $\gamma$  signaling domain, a CD3 $\delta$  signaling domain, or a DAPI2 signaling domain. Disclosed is a nucleic acid encoding a CAR and recombinant vector comprising such nucleic acids. Disclosed is a host cell comprising such nucleic acids and recombinant vectors, and a pharmaceutical composition comprising such host cells. Disclosed is method of treating disease in a patient in need of thereof, or inducing an immune response in a subject or immunizing a subject against a cancer.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於嵌合抗原受體之信號傳導域

【英文發明名稱】 SIGNALING DOMAINS FOR CHIMERIC ANTIGEN  
RECEPTORS

### 【技術領域】

【0001】 本揭露係關於細胞療法之領域，且更具體而言，係關於嵌合抗原受體(CAR)細胞療法。

### 【先前技術】

【0002】 人類癌症就其本質而言包含了已發生基因或表觀遺傳轉化而變成異常癌細胞之正常細胞。在此過程中，癌細胞開始表現與正常細胞所表現者不同之蛋白質及其他抗原。此等異常腫瘤抗原可由人體先天性免疫系統使用以特異性靶向及殺滅癌細胞。然而，癌細胞會採用各種機制來防止免疫細胞（諸如T及B淋巴球）成功靶向癌細胞。

【0003】 當前T細胞療法仰賴經富集或經修飾人類T細胞以靶向及殺滅患者之癌細胞。為了增加T細胞靶向及殺滅特定癌細胞之能力，已開發出方法來工程改造T細胞以表現將T細胞對準特定目標癌細胞之建構體。包含能夠與特定腫瘤抗原交互作用之結合域的嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor, CAR)使T細胞能夠靶向並殺滅表現該特定腫瘤抗原之癌細胞。

【0004】 存在在自體或同種異體設定中產生用於特異性靶向及殺滅癌細胞之抗原受體修飾T細胞之改善方法的需要。

**【發明內容】**

**【0005】** 揭示嵌合抗原受體(CAR)，其包含至少一種抗原結合域、跨膜域；共刺激域；及信號傳導域，其包含CD3 $\epsilon$ 信號傳導域、CD3 $\gamma$ 信號傳導域、CD3 $\delta$ 信號傳導域、或DAP-12信號傳導域中之一者。

**【0006】** 在某些實施例中，CAR包含抗CD19結合域，該結合域具有HCDR1、HCDR2、及HCDR3；及LCDR1、LCDR2、及LCDR3，其中該HCDR1包含根據SEQ ID NO: 2至4中任一者之胺基酸序列；該HCDR2包含根據SEQ ID NO: 5至7中任一者之胺基酸序列；該HCDR3包含根據SEQ ID NO: 8至10中任一者之胺基酸序列；該LCDR1包含根據SEQ ID NO: 12至14中任一者之胺基酸序列；該LCDR2包含根據SEQ ID NO: 15至17中任一者之胺基酸序列；及該LCDR3包含根據SEQ ID NO: 18至20中任一者之胺基酸序列。

**【0007】** 在某些實施例中，CAR包含抗CD19結合域，該結合域具有HCDR1、HCDR2、及HCDR3；及LCDR1、LCDR2、及LCDR3，其中該HCDR1包含根據SEQ ID NO: 24至26中任一者之胺基酸序列；該HCDR2包含根據SEQ ID NO: 27至29中任一者之胺基酸序列；該HCDR3包含根據SEQ ID NO: 30至32中任一者之胺基酸序列；該LCDR1包含根據SEQ ID NO: 34至36中任一者之胺基酸序列；該LCDR2包含根據SEQ ID NO: 37至39中任一者之胺基酸序列；及該LCDR3包含根據SEQ ID NO: 40至42中任一者之胺基酸序列。

**【0008】** 在實施例中，CAR包含重鏈可變域，其包含HCDR1、HCDR2、及HCDR3；及第一輕鏈可變域，其包含LCDR1、LCDR2、及LCDR3，其中：該重鏈可變域與SEQ ID NO: 1至少80%同一；且該輕鏈可變域

與SEQ ID NO: 11至少80%同一，或該重鏈可變域與SEQ ID NO: 24至少80%同一；且該輕鏈可變域與SEQ ID NO: 33至少80%同一。

【0009】 在實施例中，HCDR1、HCDR2、HCDR3；該LCDR1、該LCDR2、及該LCDR3係由單一多肽構成。

【0010】 在實施例中，抗CD19結合域包含scFv。在實施例中，scFv包含根據SEQ ID NO: 21或43中之一者之胺基酸序列。

【0011】 在實施例中，信號傳導域包含CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，其具有根據SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、及SEQ ID NO: 89中任一者之胺基酸序列。在實施例中，信號傳導域包含CD3 $\gamma$ 信號傳導域，其具有根據SEQ ID NO: 57之胺基酸序列。在實施例中，信號傳導域包含CD3 $\delta$ 信號傳導域，其具有根據SEQ ID NO: 55之胺基酸序列。在實施例中，信號傳導域包含DAP-12信號傳導域，其具有根據SEQ ID NO: 59之胺基酸序列。

【0012】 在實施例中，跨膜域係CD28跨膜區。在實施例中，共刺激域包含CD28共刺激區。

【0013】 在實施例中，抗CD19 CAR包含根據SEQ ID NO: 62、65、67、及69中之任一者之胺基酸序列。

【0014】 揭示一種核酸，其編碼本文所揭露之CAR。揭示一種重組載體，其包含該等核酸。揭示一種宿主細胞，其經該等核酸及重組載體轉導。在實施例中，宿主細胞包含T細胞、iNKT細胞、或NK細胞。

【0015】 揭示一種醫藥組成物，其包含該等T細胞、iNKT細胞、及/或NK細胞。揭示一種治療有需要之患者之疾病之方法，其包含將該T細胞、iNKT細胞、及/或NK細胞、或該醫藥組成物投予至該患者。揭示一種在對象中誘導

免疫反應或使對象針對癌症免疫之方法，該方法包含向對象投予該T細胞、iNKT細胞、及/或NK細胞、或該醫藥組成物。在實施例中，癌症係急性淋巴母細胞白血病(ALL)（包括非T細胞ALL）、急性骨髓白血病(acute myeloid leukemia)、B細胞前淋巴球白血病、B細胞急性淋巴樣白血病(“BALL”)、母細胞性漿細胞樣樹突細胞贅瘤、Burkitt氏淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)、慢性骨髓白血病(chronic myeloid leukemia)、慢性或急性白血病、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡淋巴瘤(FL)、毛細胞白血病、霍奇金氏病、惡性淋巴增生病況、MALT淋巴瘤、被套細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、意義不明單株免疫球蛋白增高症(MGUS)、多發性骨髓瘤、骨髓化生不良及骨髓化生不良症候群、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、漿細胞增生性病變（包括無症狀骨髓瘤（燜燃型多發性骨髓瘤或無痛骨髓瘤））、漿母細胞淋巴瘤、漿細胞樣樹突細胞贅瘤、漿細胞瘤（包括漿細胞惡液質；孤立性骨髓瘤；孤立性漿細胞瘤；髓外漿細胞瘤；及多發性漿細胞瘤）、POEMS症候群（亦稱為Crow-Fukase氏症候群；Takatsuki氏症；及PEP症候群）、原發性縱膈腔大B細胞淋巴瘤(PMBC)、小細胞或大細胞濾泡淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤(SMZL)、全身性類澱粉蛋白輕鏈類澱粉變性症、T細胞急性淋巴樣白血病(“TALL”)、T細胞淋巴瘤、變化型濾泡淋巴瘤、或Waldenstrom氏巨球蛋白血症、被套細胞淋巴瘤(MCL)、變化型濾泡淋巴瘤(TFL)、原發性縱膈腔B細胞淋巴瘤(PMBCL)、多發性骨髓瘤、毛細胞淋巴瘤/白血病、或其組合。

### 【圖式簡單說明】

【0016】 圖1繪示抗CD19 CAR的實施例，其具有選自由下列所組成群組的信號傳導域：CD3  $\zeta$ 、密碼子最佳化的CD3  $\varepsilon$ 、密碼子最佳化的  $\varepsilon$  ( $\Delta$ 181-185)、密碼子最佳化的  $\varepsilon$  (R183K)、及密碼子最佳化的  $\varepsilon$  (S178N.R183K)，採用雙順反子形式，帶有第二代CD20 CD3  $\zeta$  (CD20z) CAR。

【0017】 圖2繪示抗CD19 CAR的實施例，其具有選自由下列所組成群組的信號傳導域：密碼子最佳化的  $\varepsilon$  ( $\Delta$ 181-185)、密碼子最佳化的  $\varepsilon$  (R183K)、及密碼子最佳化的  $\varepsilon$  (S178N.R183K)。

【0018】 圖3繪示抗CD19 CAR的實施例，其具有選自由下列所組成群組的信號傳導域： $\zeta$ 、 $\zeta$  1xx、 $\varepsilon$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、Dap12、密碼子最佳化的  $\zeta$ 、及密碼子最佳化的  $\varepsilon$ 。

### 【實施方式】

相關申請案之交互參照

【0019】 本申請案主張2021年10月18日申請且標題為「Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy」（嵌合抗原受體(CAR) T細胞療法）之美國臨時專利申請案第63/256,956號之優先權，其全文以引用方式併入本文中。

用語

【0020】 為了能更輕易理解本揭露，以下先定義某些用語。下列用語及其他用語之額外定義係在本說明書中各處闡述。

【0021】 如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a)」、「一(an)」、及「該(the)」皆包括複數指稱，除非上下文另有明確說明。

【0022】 除非有具體陳述或自上下文明顯可知，如本文中所使用，用語「或(or)」係理解為涵括性的且同時涵蓋「或(or)」與「及(and)」。

【0023】 在本文中，將使用用語「及/或(and/or)」之處認為是具體揭露兩個指定特徵或組分之各者（包含或不包含另一者）。因此，如用於諸如「A及/或B」之詞組中的用語「及/或」在本文中係意欲包括A及B；A或B；A（單獨）；及B（單獨）。同樣地，如用於諸如「A、B、及/或C」之詞組中的用語「及/或」係意欲涵蓋下列態樣之各者：A、B、及C；A、B、或C；A或C；A或B；B或C；A及C；A及B；B及C；A（單獨）；B（單獨）；及C（單獨）。

【0024】 如本文所使用，用語「例如(e.g.)」僅作為實例所使用，但不意欲限制，且不應解釋為僅參考本說明書中明確列舉之彼等項目。

【0025】 用語「或更多(or more)」、「至少(at least)」、「多於(more than)」、及類似者，例如「至少一個(at least one)」應理解為包括但不限於至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149或150、200、300、400、500、600、

700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、或多於所述值。亦包括的是任何更大之數目或其間之分數。

**【0026】** 相反地，用語「不多於(no more than)」包括少於所述值之各值。例如，「不多於100個核苷酸」包括100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、及0個核苷酸。亦包括的是任何更小之數目或其間之分數。

**【0027】** 用語「複數(plurality)」、「至少二(at least two)」、「二或更多(two or more)」、「至少第二(at least second)」及類似者係理解為包括但不限於至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、

143、144、145、146、147、148、149或150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000或更多。亦包括的是任何更大之數目或其間之分數。

**【0028】** 在本說明書各處，詞語「包含(comprising)」或諸如「comprises」或「comprising」之變型將理解為有意涵括所述元素、整數、或步驟、或元素組、整數組、或步驟組，但不排除任何其他元素、整數、或步驟、或元素組、整數組、或步驟組。應理解的是，在本文中用語「包含」描述的態樣之處，亦另提供以用語「由...所組成(consisting of)」及/或「基本上由...所組成(consisting essentially of)」所描述之類似態樣。

**【0029】** 除非特定陳述或從上下文顯而易見，否則用語「約(about)」係指藉由所屬技術領域中具有通常知識者所判定之特定值或組成之可接受誤差範圍內之一值或組成，其將部分取決於該值或組成如何測量或判定，即，測量系統之限制。舉例而言，「約」或「基本上包含(comprising essentially of)」可意指根據所屬技術領域中之實踐之一或多個標準差內。「約」或「基本上包含」可意指至多10%之範圍（即 $\pm 10\%$ ）。因此，「約」可理解為在10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、或0.001%內大於或小於所述值。例如，約5 mg可包括在4.5 mg與5.5 mg之間的任何量。此外，特別是關於生物系統或程序，用語可意指至多一個數量級或至多5倍之值。除非另外說明，否則在本揭露中提供特定值或組成時，應假設「約」或「基本上包含」之意義係在該特定值或組成之可接受誤差範圍內。

**【0030】** 如本文中所述，任何濃度範圍、百分比範圍、比率範圍、或整數範圍係理解為涵括所述範圍內之任何整數值，並且在適當時亦涵括其分數（諸如整數之十分之一及百分之一），除非另有指示。

**【0031】** 本文中所使用之單位、前綴、及符號係使用其國際單位制(SI)公認形式來提供。數字範圍涵括定義該範圍之數字。

**【0032】** 除非另有定義，否則本文中所使用之所有技術及科學用語具有與本揭露所相關之技術領域中具有通常知識者一般理解者相同的意義。舉例而言，Juo, “The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology”, 2<sup>nd</sup> ed., (2001), CRC Press；“The Dictionary of Cell & Molecular Biology”, 5<sup>th</sup> ed., (2013), Academic Press；及“The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology”, Cammack *et al.* eds., 2<sup>nd</sup> ed, (2006), Oxford University Press，提供所屬技術領域中具有通常知識者用於本揭露之許多用語的一般詞典。

**【0033】** 「投予(administering)」係指使用所屬技術領域中具有通常知識者已知的任何各種方法及遞送系統將藥劑實體引入至對象，諸如本文所揭示之經工程改造之T細胞。用於本文所揭示之配方的例示性投予途徑包括靜脈內、肌內、皮下、腹膜內、脊椎、或其他腸胃外投予途徑，例如藉由注射或輸注。片語「腸胃外投予(parenteral administration)」意指除腸內及局部(topical)投予以外的投予模式，通常藉由注射，且包括但不限於靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、淋巴內(intralymphatic)、病灶內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下(subcuticular)、關節內、囊下、蜘蛛膜下、脊椎內、硬膜外、及胸骨內注射及輸注、以及體內電穿孔。在一些實施例中，配方經由非腸胃外途徑投予，例如經口。其他非腸胃外途徑包括局部、上皮或黏膜投予途

徑，例如，鼻內、陰道內、直腸、舌下、或局部。亦可執行投予，例如一次、多次、及/或經過一或多個延伸週期。

**【0034】** 用語「經活化(activated)」及「活化(activation)」係指已經足夠刺激以誘導可偵測細胞增生之T細胞的狀態。在一個實施例中，活化亦可與誘導之細胞介素產生及可偵測效應功能相關。用語「經活化T細胞(activated T cell)」尤其係指增生之T細胞。透過單獨TCR產生的信號可能不足以完全活化T細胞，且亦可能需要一或多個二級或共刺激信號。因此，T細胞活化包含透過TCR/CD3複合物之初級刺激信號及一或多個二級共刺激信號。共刺激可藉由已接受初級活化信號之T細胞（諸如透過TCR/CD3複合物之刺激）的增生及/或細胞介素產生來證明。

**【0035】** 用語「劑(agent)」可指任何類別的分子或實體，其包含或係複數個分子或實體，其中任一者可係例如多肽、核酸、醣、脂質、小分子、金屬、細胞（諸如T細胞或此類細胞之先驅細胞）、或生物體（例如其部分或萃取物）、或其組分。在一些實施例中，藥劑可以單離或純形式使用。在一些實施例中，藥劑可以粗製或不純形式使用。在一些實施例中，藥劑可被提供為群體、集合、或庫，例如可經篩選以識別或表徵其中存在之成員。

**【0036】** 用語「同種異體(allogeneic)」係指衍生自一個個體之任何材料，其接著引入相同物種之另一個體，例如同種異體T細胞移植。

**【0037】** 用語「自體(autologous)」係指任何衍生自相同個體之材料，該材料之後會再重新引入至該個體。例如，本文所述之經工程改造之自體細胞療法方法涉及自患者收集淋巴球，接著將其工程改造以表現例如CAR構築體，接著投予回同一位患者。

**【0038】** 用語「抗體(antibody)」(Ab)包括但不限於特異性結合至抗原之醣蛋白免疫球蛋白。一般而言，且抗體可包含至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈，其等藉由二硫鍵或其抗原結合分子互相連接。各H鏈包含重鏈可變區（在本文中縮寫為VH）及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個恆定域，CH1、CH2、及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區（在本文中縮寫為VL）及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個恆定域，CL。VH及VL區可進一步細分成高度變異區，稱為互補決定區(CDR)，其中散布稱為架構區(FR)之更具保守性的區。各VH及VL包含三個CDR及四個FR，以下列順序從胺基端排列到羧基端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原交互作用之結合域。Ab之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，包括免疫系統之各種細胞（例如效應細胞）及經典補體系統之第一組分(C1q)。一般而言，人類抗體係大約150 kD之四聚體藥劑，由兩個同一之重(H)鏈多肽（各自約50 kD）及兩個同一之輕(L)鏈多肽（各自約25 kD）組成，其等彼此締合成一般稱為「Y形狀」結構。重鏈及輕鏈藉由單一二硫鍵彼此相連或連接；其他兩個二硫鍵將重鏈鉸鏈區彼此連接，使得二聚體彼此連接並形成四聚體。天然產生之抗體亦經醣化，例如在CH2域上。

**【0039】** 用語「人類抗體(human antibody)」意欲包含具有可變及恆定域序列之抗體，其由人類免疫球蛋白序列或與其無法區分之序列產生、組裝、或衍生。在一些實施例中，抗體（或抗體組分）可視為「人類」，即使其胺基酸序列包含未由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之殘基或元素（例如藉由體外隨機或位點特異性突變誘發引入之變體，或藉由體內體細胞突變引入之變體）。用語「人源化(humanized)」意欲包含具有可變域之抗體，該可變域之序列衍生

自非人類物種（例如小鼠）之可變域，經修飾以更類似於人類生殖系編碼之序列。在一些實施例中，「人源化」抗體包含一或多個實質上具有人類架構域之胺基酸序列的架構域、及一或多個實質上具有與非人類抗體之胺基酸序列相同之胺基酸序列的互補決定區。在一些實施例中，人源化抗體包含至少一部分免疫球蛋白恆定區(Fc)，通常係人類免疫球蛋白恆定域之至少一部分。在一些實施例中，人源化抗體可包含人類重鏈恆定域之C<sub>H</sub>1、鉸鏈、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3、及可選地C<sub>H</sub>4區。

**【0040】** 抗體可包括例如單株抗體、重組產生之抗體、單特異性抗體、多特異性抗體（包括雙特異性抗體）、人類抗體、經工程改造之抗體、人源化抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚體抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-抗體重鏈對、內抗體(intrabody)、抗體融合（在本文中有時稱為「抗體接合物(antibody conjugate)」）、異源接合物抗體、單域抗體、單價抗體、單鏈抗體或單鏈Fv(scFv)、駱駝化抗體(camelized)、親合抗體(affybody)、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、雙硫鍵連接之Fv(sdFv)、抗獨特型(anti-idiotypic)（抗Id）抗體（包括例如抗-抗Id抗體）、微抗體(minibody)、域抗體、合成抗體（在本文中有時稱為「抗體擬似物(antibody mimetic)」）、及任何上述者之抗原結合片段。在某些實施例中，本文所述之抗體係指多株抗體群。抗體亦可包含例如Fab'片段、Fd'片段、Fd片段、單離CDR、單鏈Fvs、多肽-Fc融合、單域抗體（例如，鯊魚單域抗體，諸如IgNAR或其片段）、駱駝科動物抗體、單鏈或Tandem雙抗體(TandAb®)、Anticalins®、Nanobodies®微型體、BiTE®、錨蛋白重複蛋白質或DARPINs®、Avimers®、DART、類TCR抗體、Adnectins®、

Affilins®、Trans-bodies®、Affibodies®、TrimerX®、微蛋白、Fynomers®、Centyrins®、及KALBITOR®。

【0041】 免疫球蛋白可衍生自通常已知同型中之任一者，包括但不限於IgA、分泌IgA、IgG、IgE、及IgM。IgG亞類亦為所屬技術領域中具有通常知識者所熟知，且包括但不限於人類IgG1、IgG2、IgG3、及IgG4。「同型(isotype)」係指由重鏈恆定區基因編碼之Ab類或亞類（例如IgM或IgG1）。用語「抗體(antibody)」包括舉實例而言天然存在及非天然存在之Ab兩者；單株及多株Ab；嵌合及人源化Ab；人類或非人類Ab；全合成Ab；及單鏈Ab。非人類Ab可藉由重組方法來人源化以減少其在人中之免疫原性。在未明確陳述之情況下，且除非上下文另外指示，否則用語「抗體(antibody)」亦包括任何前述免疫球蛋白之抗原結合片段或抗原結合部分，且包括單價及二價片段或部分及單鏈Ab。

【0042】 「抗原結合分子(antigen binding molecule)」、「抗原結合部分(antigen binding portion)」、「抗原結合片段(antigen binding fragment)」、或「抗體片段(antibody fragment)」或「抗原結合域(antigen binding domain)」係指包含衍生分子之抗體之抗原結合部分（例如CDR）之任何分子。抗原結合分子可包括抗原互補決定區(CDR)。抗體片段之實例包括但不限於形成自抗原結合分子之Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及Fv片段、dAb、線性抗體、scFv抗體、及多特异性抗體。肽體(peptibody)（亦即，包含肽結合域之Fc融合分子）係合適抗原結合分子之另一個實例。在一些實施例中，抗原結合分子結合至腫瘤細胞上之抗原。在一些實施例中，抗原結合分子結合至涉及過度增生性疾病之細胞上的抗原或結合至病毒或細菌抗原。在某些實施例中，抗原結合分子係嵌合抗原受體

(CAR)。在某些實施例中，抗原結合分子或域結合CD19。在某些實施例中，抗原結合分子或域係特異性結合至抗原之抗體片段，包括其互補決定區(CDR)之一或多者。在進一步實施例中，抗原結合分子係單鏈可變片段(scFv)。

**【0043】** 在一些情況下，CDR與參考抗體（例如本揭露之抗體）中所發現之一個CDR及/或本揭露中所提供之CDR之序列實質上同一。在一些實施例中，CDR與參考CDR（例如在本揭露（例如在表4中）中提供之CDR）實質上同一，其中與參考CDR相比，其序列同一或含有介於1、2、3、4或5（例如1至5）之間的胺基酸取代。在一些實施例中，CDR與參考CDR實質上同一，其中其顯示與參考CDR至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%之序列同一性（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95至100%）。在一些實施例中，CDR與參考CDR實質上同一，其中其顯示與參考CDR至少96%、96%、97%、98%、99%、或100%之序列同一性。在一些實施例中，CDR與參考CDR實質上同一，其中相較於參考CDR，CDR內之一個胺基酸經缺失、添加、或取代，而該CDR之其他部分具有與參考CDR之胺基酸序列同一之胺基酸序列。在一些實施例中，CDR與參考CDR實質上同一，其中相較於參考CDR，CDR內之2、3、4、或5（例如2至5）個胺基酸經缺失、添加、或取代，而該CDR之其他部分具有與參考CDR之胺基酸序列同一之胺基酸序列。在各種實施例中，抗原結合片段與參考抗體結合相同抗原。在各種實施例中，抗原結合片段與參考抗體交叉競爭，例如結合至與參考抗體實質上相同或同一之表位。

**【0044】** 抗原結合片段可藉由任何手段產生。舉例而言，在一些實施例中，抗原結合片段可藉由完整抗體碎斷而酶促或化學產生。在一些實施例中，抗原結合片段可重組產生（諸如藉由經工程改造之核酸序列之表現）。在一些實施例中，抗原結合片段可完全或部分地合成產生。在一些實施例中，抗原結合片段可具有至少約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190個胺基酸或更多之長度；在一些實施例中，至少約200個胺基酸（例如50至100、50至150、50至200、或100至200個胺基酸）。

**【0045】** 用語「可變區(variable region)」或「可變域(variable domain)」可互換使用。可變區一般係指抗體之一部分，通常係輕鏈或重鏈之一部分，一般係成熟重鏈中胺基端的約110至120個胺基及成熟輕鏈中約90至115個胺基酸，其在抗體之間的序列差異很大，且係用於特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。序列之變異性集中在稱為互補決定區(CDR)之區中，而可變域中更高度保守的區稱為架構區(FR)。不希望受任何特定機制或理論束縛，咸信輕鏈及重鏈之CDR主要負責抗體與抗原之交互作用及特異性。在某些實施例中，可變區係人類可變區。在某些實施例中，可變區包含啮齒動物或鼠類CDR及人類架構區(FR)。在實施例中，可變區係靈長類（例如非人類靈長類）可變區。在某些實施例中，可變區包含啮齒動物或鼠類CDR及靈長類（例如非人類靈長類）架構區(FR)。

**【0046】** 用語「VL」及「VL域(VL domain)」可互換使用以指抗體或其抗原結合分子之輕鏈可變區。

**【0047】** 用語「VH」及「VH域(VH domain)」可互換使用以指抗體或其抗原結合分子之重鏈可變區。

【0048】 通常使用之CDR之許多定義：Kabat編號、Chothia編號、AbM編號、或Contact編號。AbM定義係Oxford Molecular之AbM抗體模型化軟體所使用之兩者之間之妥協。Contact定義係基於可用複雜晶體結構之分析。

表1. CDR編號

環	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B (Kabat 編號)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
H1	H31--H35 (Chothia 編號)	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

【0049】 用語「Kabat編號(Kabat numbering)」及類似用語在所屬技術領域中被認可，且指抗體或其抗原結合分子之重鏈及輕鏈可變區中之編號胺基酸殘基之系統。在某些態樣中，抗體之CDR可根據Kabat編號系統判定（參見例如Kabat EA & Wu TT (1971) *Ann NY Acad Sci* 190: 382-391 and Kabat EA *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242）。使用Kabat編號系統，抗體重鏈分子內之CDR一般存在於胺基酸位置31至35，其可選地可包括一或兩個35以後之額外胺基酸（在Kabat編號方案中稱為35A及35B）(CDR1)、胺基酸位置50至65 (CDR2)、及胺基酸位置95至102 (CDR3)。使

用Kabat編號系統，抗體輕鏈分子內之CDR一般存在於胺基酸位置24至34 (CDR1)、胺基酸位置50至56 (CDR2)、及胺基酸位置89至97 (CDR3)。在一特定實施例中，本文所述之抗體之CDR已根據Kabat編號方案判定。

**【0050】** 在某些態樣中，抗體之CDR可根據Chothia編號方案判定，其係指免疫球蛋白結構環之位置（參見例如Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917；Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948；Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817；Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82；及美國專利第7,709,226號）。一般而言，當使用Kabat編號慣例，Chothia CDR-H1環存在於重鏈胺基酸26至32、33、或34處，Chothia CDR-H2環存在於重鏈胺基酸52至56處，且Chothia CDR-H3環存在於重鏈胺基酸95至102處，而Chothia CDR-L1環存在於輕鏈胺基酸24至34處，Chothia CDR-L2環存在於輕鏈胺基酸50至56處，且Chothia CDR-L3環存在於輕鏈胺基酸89至97處。在使用Kabat編號慣例編號時，Chothia CDR-HI環之結束在H32與H34之間之變化，取決於環的長度（此係因為Kabat編號方案將插入部分置於H35A及H35B處；若35A及35B均不存在，則環在32處結束；若僅存在35A，則環在33處結束；若35A及35B均存在，則環在34處結束）。在一特定實施例中，本文所述之抗體之CDR已根據Chothia編號方案判定。

**【0051】** 用語「恆定區(constant region)」及「恆定域(constant domain)」可互換且具有所屬技術領域中通用的含義。恆定區係抗體部分，例如輕鏈及/或重鏈之羧基端部分，其不直接涉及抗體與抗原之結合，但可展現各種效應功能，諸如與Fc受體交互作用。免疫球蛋白分子之恆定區通常具有相對於免疫球蛋白可變域更保守之胺基酸序列。

【0052】 當參考抗體使用時，用語「重鏈(heavy chain)」可指任何不同類型，例如 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、及 $\mu$ ，基於恆定域之胺基酸序列，其各別產生IgA、IgD、IgE、IgG、及IgM類別之抗體，包括IgG之亞類，例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、及IgG<sub>4</sub>。

【0053】 當參考抗體使用時，用語「輕鏈(light chain)」可指任何不同類型，例如基於恆定域之胺基酸序列之 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。輕鏈胺基酸序列係所屬技術領域中所熟知。在特定實施例中，輕鏈係人類輕鏈。

【0054】 「抗原(antigen)」係指可刺激人類或動物產生抗體或T細胞反應之化合物、組成物或物質，包括組成物（諸如包括腫瘤特異性蛋白質之一者），該等組成物被注射或吸收至人類或動物中。抗原與特定體液或細胞免疫之產物反應，包括藉由異源抗原（諸如所揭示之抗原）所誘導者。「目標抗原(target antigen)」或「所關注之目標抗原(target antigen of interest)」係在其他正常（所欲）細胞之表面上未實質上發現之抗原，且本文所涵蓋之CAR之結合域經設計以結合至其。所屬技術領域中具有通常知識者將容易地理解，任何大分子包括幾乎所有蛋白質或肽可作為抗原。抗原可內源性表現，即藉由基因體DNA表現，或可重組表現。抗原可對特定組織（諸如癌細胞）具有特異性，或其可廣泛表現。此外，較大分子之片段可充當抗原。在一個實施例中，抗原係腫瘤抗原。在一個具體實施例中，抗原係CD19之全部或片段。在某些實施例中，抗原可包括但不限於707-AP（707丙胺酸脯胺酸）、AFP（ $\alpha$  (a)-胎兒蛋白）、ART-4（由T4細胞識別之腺癌抗原）、BAGE（B抗原；b-連環蛋白(b-catenin)/m、b-連環蛋白/突變的）、BCMA（B細胞成熟抗原）、Bcr-abl（斷點簇區-Abelson）、CAIX（碳酸酐酶IX）、CD19（分化簇19）、CD20（分化簇

20)、CD22(分化簇22)、CD30(分化簇30)、CD33(分化簇33)、CD44v7/8(分化簇44,外顯子7/8)、CAMEL(黑色素瘤上由CTL識別之抗原)、CAP-1(癌胚抗原肽-1)、CASP-8(凋亡蛋白酶-8)、CDC27m(突變之細胞分裂週期27)、CDK4/m(突變之週期蛋白依賴型激酶4)、CEA(癌胚抗原)、類C型凝集素-1(CLL-1)、CT(癌症/睪丸(抗原))、Cyp-B(親環素B)、DAM(分化抗原黑色素瘤)、EGFR(表皮生長因子受體)、EGFRvIII(表皮生長因子受體變體III)、EGP-2(表皮醣蛋白2)、EGP-40(表皮醣蛋白40)、ErbB2、3、4(紅血球母細胞性白血病病毒致癌基因同源物-2、-3、4)、ELF2M(突變之延伸因子2)、ETV6-AML1(Ets變體基因6/急性骨髓性白血病1基因ETS)、FBP(葉酸結合蛋白)、fAchR(胎兒乙醯膽鹼受體)、G250(醣蛋白250)、GAGE(G抗原)、GD2(二唾液酸神經節苷脂(disialoganglioside)2)、GD3(二唾液酸神經節苷脂3)、磷脂肌醇聚醣3(GPC3)、GnT-V(N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶V)、Gp100(醣蛋白100kD)、HAGE(螺旋酶(helicase)抗原)、HER-2/neu(人表皮受體-2/神經性;亦稱為EGFR2)、HLA-A(人白血球抗原A)、HPV(人乳頭狀瘤病毒)、HSP70-2M(突變之熱休克蛋白70-2)、HST-2(人印戒腫瘤(signet ring tumor)-2)、hTERT或hTRT(人端粒酶反轉錄酶)、iCE(腸羧基酯酶)、IL-13R-a2(介白素-13受體次單元 $\alpha$ -2)、KIAA0205、KDR(激酶插入結構域受體)、 $\kappa$ 輕鏈、LAGE(L抗原)、LDLR/FUT(低密度脂質受體/GDP-L-岩藻糖:b-D-半乳糖苷酶2-a-L岩藻糖基轉移酶)、LeY(路易斯-Y抗體)、LICAM(L1細胞黏附分子)、MAGE(黑色素瘤抗原)、MAGE-A1(黑色素瘤相關抗原1)、間皮素(mesothelin)、鼠CMV感染之細胞、MART-1/Melan-A(由T細胞識別之黑色

素瘤抗原-1/黑色素瘤抗原A)、MC1R(黑皮質素1受體)、肌球蛋白/m(突變之肌球蛋白)、MUC1(黏蛋白1)、MUM-1、MUM-2、MUM-3(突變之黑色素瘤泛蛋白1、2、3)、NA88-A(患者M88之NA cDNA選殖株)、NKG2D(天然殺手細胞2族,成員D)配體、NY-BR-1(紐約乳房分化抗原1)、NY-ESO-1(紐約食道鱗狀細胞癌-1)、致癌胎兒抗原(h5T4)、P15(蛋白15)、p190次要bcr-ab1(190KD bcr-ab1蛋白質)、Pml/RARa(前髓細胞性白血病/視黃酸受體a)、PRAME(優先表現之黑色素瘤抗原)、PSA(前列腺特異性抗原)、PSCA(前列腺幹細胞抗原)、PSMA(前列腺特異性膜抗原)、RAGE(腎抗原)、RU1或RU2(腎泛蛋白1或2)、SAGE(肉瘤抗原)、SART-1或SART-3(鱗狀抗原排斥腫瘤1或3)、SSX1、SSX2、SSX3、SSX4(滑膜肉瘤X1、X2、X3、X4)、TAA(腫瘤相關抗原)、TAG-72(腫瘤相關糖蛋白72)、TEL/AML1(轉位Ets家族性白血病/急性骨髓性白血病1)、TPI/m(突變之磷酸丙糖(triosephosphate)異構酶)、TRP-1(酪胺酸酶相關性蛋白1或gp75)、TRP-2(酪胺酸酶相關性蛋白2)、TRP-2/INT2(TRP-2/內含子2)、VEGF-R2(血管內皮生長因子受體2)、或WT1(威爾姆氏腫瘤(Wilm's tumor)基因)。

**【0055】** 「目標(target)」係藉由結合域、抗原結合系統、CAR、或抗原結合劑(例如抗體)結合之任何分子。

**【0056】** 「抗原特異性靶向區(antigen-specific targeting region)」(ASTR)係指靶向特定抗原之CAR之區域。CAR上之靶向區係胞外。在一些實施例中,抗原特異性靶向區包含抗體或其功能等效物或其片段或其衍生物,且靶向區之各者靶向不同抗原。靶向區可包含全長重鏈、Fab片段、單鏈Fv(scFv)片段、二

價單鏈抗體或雙抗體，其各者對目標抗原具有特異性。然而，許多替代方案，諸如連接細胞介素（其導致識別帶有細胞介素受體之細胞）、親和抗體 (affibody)、來自天然存在受體之配體結合域、受體之可溶性蛋白質/肽配體（例如在腫瘤細胞上）、肽、及疫苗，以促使免疫反應，其可各自用於本揭露案之各種實施例中。事實上，如所屬技術領域中具有通常知識者將瞭解，幾乎任何與具有高親和力之給定抗原結合之分子均可用作抗原特異性靶向區。

**【0057】** 「抗原呈現細胞(Antigen presenting cell)」或「APC」係指處理並向T細胞呈現抗原之細胞。例示性APC包含樹突細胞、巨噬細胞、B細胞、某些活化上皮細胞、及能夠TCR刺激及適當T細胞共刺激之其他細胞類型。

**【0058】** 「抗腫瘤效應(anti-tumor effect)」係指可呈現為下列之生物效應：腫瘤體積減少、腫瘤細胞數目減少、腫瘤細胞增生減少、轉移數目減少、整體或無進展存活期增加、預期壽命增加、或改善與腫瘤相關之各種生理症狀。抗腫瘤效應亦可指預防腫瘤出現。

**【0059】** 若一者之存在、水平、及/或形式與另一者相關，則兩個事件或實體「相關聯(associated)」。例如，若實體（例如多肽、基因印記、代謝物、微生物等）之存在、水平、及/或形式與疾病、病症、或病況之發生率及/或易感性相關（例如跨越相關群體），則實體被視為與疾病、病症、或病況相關聯。例如，若二或更多個實體直接或間接交互作用，則其等彼此實體上「相關聯」，使得其等彼此係且/或保持在實體上接近（例如結合）。在額外的實例中，彼此實體上相關聯的二或更多個實體係彼此共價鍵聯或連接，或例如藉由氫鍵、凡得瓦交互作用、疏水性交互作用、磁性、及其組合之手段非共價締合。

**【0060】** 「結合親和力(binding affinity)」通常係指分子（例如抗體）之單一結合位點與其結合夥伴(partner)（例如抗原）之間的非共價交互作用之總和的強度。除非另外指示，否則「結合親和力」係指固有結合親和力，其反映結合對（例如抗體及抗原）之成員之間的1:1交互作用。分子X針對其夥伴Y之親和力通常可由解離常數( $K_D$ )表示。親和力可以所屬技術領域中已知之多種方式測量及/或表現，包括但不限於平衡解離常數( $K_D$ )及平衡締合常數( $K_A$ )。 $K_D$ 係由 $k_{off}/k_{on}$ 之商計算，而 $K_A$ 係由 $k_{on}/k_{off}$ 之商計算。 $k_{on}$ 係指例如抗體至抗原之締合速率常數，且 $k_{off}$ 係指例如抗體至抗原之解離。 $k_{on}$ 及 $k_{off}$ 可藉由所屬領域中具有通常知識者已知之技術判定，諸如BIAcore®或KinExA。

**【0061】** 用語「 $K_D$ 」(M)係指特定抗體抗原交互作用之解離平衡常數，或抗體或抗體結合片段與抗原結合之解離平衡常數。 $K_D$ 與結合親和力之間存在倒數關係，因此 $K_D$ 值越小，親和力愈高，即越強。因此，用語「較高親和力(higher affinity)」或「較強親和力(stronger affinity)」係關於形成交互作用之能力較高且因此 $K_D$ 值較小，且相反地用語「較低親和力(lower affinity)」或「較弱親和力(weaker affinity)」係關於形成交互作用之能力較低且因此 $K_D$ 值較大。在一些情況下，特定分子（例如抗體）與其交互作用夥伴分子（例如抗原X）之結合親和力（或 $K_D$ ）相較於該分子（例如抗體）與另一交互作用夥伴分子（例如抗原Y）之結合親和力高，可表示為藉由將較大 $K_D$ 值（較低或較弱親和力）除以較小 $K_D$ （較高或較強親和力）而判定之結合比率，例如表示為大5倍或10倍之結合親和力，視情況而定。

**【0062】** 用語「 $k_d$ 」（sec<sup>-1</sup>或1/s）係指特定抗體抗原交互作用之解離速率常數，或抗體或抗體結合片段之解離速率常數。所述值亦稱為 $k_{off}$ 值。

【0063】 用語「 $k_a$ 」 ( $M^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ 或 $1/M$ ) 係指特定抗體抗原交互作用之締合速率常數，或抗體或抗體結合片段之締合速率常數。

【0064】 用語「 $K_A$ 」 ( $M^{-1}$ 或 $1/M$ ) 係指特定抗體抗原交互作用之締合平衡常數，或抗體或抗體結合片段之締合平衡常數。藉由將 $k_a$ 除以 $k_d$ 來獲得締合平衡常數。

【0065】 用語「結合(binding)」通常係指或二或更多個實體之間或之中的非共價締合。直接結合涉及實體或部分之間的實體接觸。「間接(indirect)」結合涉及藉由與一或多個中間實體實體接觸之方式的物理交互作用。可在多種情形中之任一者中評估二或更多個實體之間的結合，例如其中在單離中或在更複雜系統（例如當與載體實體共價或以其他方式締合時、及/或在生物系統（諸如細胞）中）之情況下研究交互作用的實體或部份。

【0066】 用語「免疫特異性結合(immunospecifically bind)」、「免疫特異性辨識(immunospecifically recognize)」、「特異性結合(specifically bind)」、及「特異性辨識(specifically recognize)」係抗體在上下文中之類似用語，且指結合至抗原（例如表位或免疫複合物）之分子，所屬技術領域中具有通常知識者理解此類結合。舉例而言，特異性結合至抗原之分子可結合至其他肽或多肽，通常具有較低親和力，藉由例如免疫檢定、BIAcore®、KinExA 3000儀器 (Sapidyne Instruments, Boise, ID)、或所屬技術領域中已知之其他檢定所判定。在特定實施例中，特異性結合至抗原之分子以至少2 logs、2.5 logs、3 logs、4 logs之 $K_A$ ，或大於分子結合至另一抗原時之 $K_A$ 結合至該抗原。相較於與具有不是目標之實體（即非目標）的結合域、抗體、或CAR之締合，結合可包含與具有結合域、抗體、或CAR之目標的結合域、抗體、或CAR之優先締合。在一些

實施例中，若結合域、抗體、或CAR與目標之間的結合，相較於結合域、抗體、或CAR與非目標之結合大於2倍、大於5倍、大於10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、或大於100倍，則結合域、抗體、或CAR選擇性地結合目標。在一些實施例中，若結合親和力小於約 $10^{-5}$  M、小於約 $10^{-6}$  M、小於約 $10^{-7}$  M、小於約 $10^{-8}$  M、或小於約 $10^{-9}$  M，則結合域、抗體、或CAR選擇性地結合目標。

**【0067】** 在另一實施例中，特異性結合至抗原之分子以約 $1 \times 10^{-7}$  M之解離常數( $K_d$ )結合。在一些實施例中，當 $K_d$ 係約 $1 \times 10^{-9}$  M至約 $5 \times 10^{-9}$  M時，抗原結合分子以「高親和力」特異性結合抗原。在一些實施例中，當 $K_d$ 係 $1 \times 10^{-10}$  M至約 $5 \times 10^{-10}$  M時，抗原結合分子以「非常高親和力」特異性結合抗原。在一個實施例中，抗原結合分子具有 $10^{-9}$  M之 $K_d$ 。在一實施例中，釋放速率小於約 $1 \times 10^{-5}$ 。在實施例中，抗原結合分子以約 $1 \times 10^{-10}$  M至約 $5 \times 10^{-10}$  M之 $K_d$ 結合CD19。

**【0068】** 在某些實施例中，本文提供一種結合至目標人類抗原之抗體或其抗原結合分子，例如在某些實施例中，抗原結合分子以比結合至另一物種的目標抗原高5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、或更高的親和力結合至CD19，如藉由例如放射性免疫檢定、表面電漿共振、或動力學排除檢定所測量。在一具體實施例中，結合至目標人類抗原之本文所述之抗體或其抗原結合分子將以小於該抗體或其抗原結合分子與人類抗原結合之10%、15%、或20%與另一物種之目標抗原結合，如藉由例如放射性免疫檢定、表面電漿共振、或動力學排除檢定所測量。

【0069】 「癌症(cancer)」係指一組廣泛的各種疾病，其特徵在於體內異常細胞不受控制的生長。未經調節細胞分裂及生長導致侵襲鄰近組織之惡性腫瘤形成，且亦可經由淋巴系統或血流轉移至本體之遠端部分。「癌症」或「癌症組織」可包括腫瘤。可藉由本揭露之方法治療之癌症之實例包括但不限於免疫系統之癌症，包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、及其他白血球惡性疾病。在一些實施例中，本揭露之方法可用於縮小衍生自例如下列之腫瘤的腫瘤大小：骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門部位癌、胃癌、睪丸癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、多發性骨髓瘤、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、原發性縱膈腔大B細胞淋巴瘤(PMBC)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡淋巴瘤(FL)、變化型濾泡淋巴瘤、脾邊緣區型淋巴瘤(SMZL)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、慢性或急性白血病、急性骨髓白血病、慢性骨髓白血病、急性淋巴母細胞白血病(ALL)（包括非T細胞ALL）、慢性淋巴球性白血病(CLL)、兒童實體腫瘤、淋巴球性淋巴瘤、膀胱癌、腎臟或輸尿管癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊柱腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T細胞淋巴瘤、環境誘導之癌症（包括由石棉誘導者）、其他B細胞惡性疾病、及該等癌症之組合。在一個特定實施例中，癌症係多發性骨髓瘤。特定癌症可回應於化學或輻射療法或癌症可為難治性的。難治性癌症係指手術介入不能修正之癌症，及癌症初始不回應於化學或輻射療法或癌症隨時間推移而變得不反應。癌症進一步包括在二或更多線全身性療法之

後的復發性或難治性，包括非特指型之瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、在二或更多線全身性療法之後的原發性縱膈腔大B細胞淋巴瘤、高級別B細胞淋巴瘤、及由濾泡淋巴瘤引起之DLBCL、及濾泡淋巴瘤。

**【0070】** 「趨化因子(chemokine)」係一種細胞介素類型，其介導細胞趨化性或方向性移動。趨化因子之實例包括但不限於IL-8、IL-16、伊紅趨素、伊紅趨素-3、巨噬細胞衍生之趨化因子(MDC或CCL22)、單核球趨化蛋白1(MCP-1或CCL2)、MCP-4、巨噬細胞炎性蛋白1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1a)、MIP-1 $\beta$ (MIP-1b)、 $\gamma$ 誘導蛋白10(IP-10)、及胸腺及活化調節趨化因子(TARC或CCL17)。

**【0071】** 「嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor)」或「CAR」係指經工程改造以包含結合域之分子及活化免疫細胞(例如T細胞，諸如初始T細胞、中央記憶T細胞、效應記憶T細胞、iNKT細胞、NK細胞或其組合)在抗原結合時之手段。CAR亦稱為人工T細胞受體、嵌合T細胞受體或嵌合免疫受體。在一些實施例中，CAR包含結合域、胞外域、跨膜域、一或多個共刺激域、及胞內信號傳導域。已經基因工程改造以表現嵌合抗原受體之T細胞可稱為CAR T細胞。

**【0072】** 「胞外域(extracellular domain)」(或「ECD」)係指多肽之部分，其當多肽存在於細胞膜中時，應理解為位於細胞膜外之胞外空間中。

**【0073】** 如本文中所使用，用語「胞外配體結合域(extracellular ligand-binding domain)」係指能夠結合配體(例如細胞表面分子)之寡肽或多肽。例如，可選擇胞外配體結合域以識別作用為與特定疾病狀態(例如癌症)相關之

目標細胞上之細胞表面標記的配體。可作用為配體之細胞表面標記之實例包括與病毒、細菌、及寄生蟲感染、自體免疫疾病、及癌細胞相關者。

【0074】 CAR之結合域後面可接著「間隔子(spacer)」或「鉸鏈(hinge)」，其係指將抗原結合域移動遠離效應細胞表面以實現適當細胞/細胞接觸、抗原結合、及活化的區(Patel et al., *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419)。CAR中之鉸鏈區通常在跨膜(TM)與結合域之間。在某些實施例中，鉸鏈區係免疫球蛋白鉸鏈區，且可為野生型免疫球蛋白鉸鏈區或改變之野生型免疫球蛋白鉸鏈區。用於本文所描述之CAR中之其他例示性鉸鏈區包括衍生自類型1膜蛋白(諸如CD8 $\alpha$ 、CD4、CD28、及CD7)之胞外區的鉸鏈區，其可係來自此等分子之野生型鉸鏈區，或可經改變。

【0075】 「跨膜(transmembrane)」區或域係CAR之一部分，其將胞外結合部分錨定至免疫效應細胞之質膜，並促進結合域與目標抗原之結合。跨膜域可係CD3 $\zeta$ 跨膜域，然而可採用之其他跨膜域包括由CD8 $\alpha$ 、CD4、CD28、CD45、CD9、CD16、CD22、CD33、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、及CD154獲得者。在一個實施例中，跨膜域係CD137之跨膜域。在某些實施例中，跨膜域係合成，其中其將主要包括疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸。

【0076】 「胞內信號傳導域(intracellular signaling domain)」或「信號傳導域(signaling domain)」係指嵌合抗原受體蛋白之部分，其參與將有效CAR結合至目標抗原之訊息轉導至免疫效應細胞內部以引發效應細胞功能，例如活化、細胞介素產生、增生、及細胞毒性活性，包括細胞毒性因子至結合CAR之目標細胞的釋放、或與胞外CAR域結合之抗原引發的其他細胞反應。用語「效應功能(effector function)」係指細胞之特定功能。T細胞之效應功能，例如可係

細胞溶解活性或包括細胞介素之分泌之幫助或活性。因此，用語「胞內信號傳導域(intracellular signaling domain)」或「信號傳導域(signaling domain)」在本文中可互換使用，指蛋白質之部分，其轉導效應功能信號且引導細胞以執行特定功能。雖然通常可採用整個胞內信號傳導域，但在許多情況下，不必使用整個域。在使用胞內信號傳導域之截短部分的程度，只要其轉導效應功能信號，則可使用此類截短部分代替整個域。用語胞內信號傳導域意欲包括足以轉導效應功能信號之胞內信號傳導域之任何截短部分。胞內信號傳導域亦稱為「信號轉導域」，且通常源自人類CD3或FcR $\gamma$ 鏈之部分。

**【0077】** 已知透過單獨T細胞受體產生之信號不足於完全活化T細胞且亦需要二級或共刺激信號。因此，T細胞活化可說是藉由兩種不同類別的細胞質信號傳導序列介導：透過T細胞受體起始抗原依賴性初級活化者（初級細胞質信號傳導序列）及以抗原非依賴性方式作用者，以提供二級或共刺激信號（二級細胞質信號傳導序列）。初級活化作用之細胞質信號傳導序列可含有稱為基於免疫受體酪胺酸之活化模體或ITAM之信號傳導模體。含有特別用於本揭露之初級細胞質信號傳導序列之ITAM的實例包括衍生自DAP-12、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、及CD3 $\epsilon$ 者。

**【0078】** 如本文所用，用語「共刺激信號傳導域(costimulatory signaling domain)」或「共刺激域(costimulatory domain)」係指包含共刺激分子之胞內域之CAR之部分。共刺激分子係除抗原受體或Fc受體以外之細胞表面分子，其提供T淋巴球在結合至抗原時為有效活化及功能所需之第二信號。此類共刺激分子之實例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS (CD278)、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2、及特

異性結合CD83之配體。因此，雖然本揭露提供衍生自CD28、及4-1BB之例示性共刺激域，其他共刺激域係考慮搭配本文所述之CAR使用。納入一或多種共刺激信號傳導域可增強T細胞表現CAR受體之功效及擴增。胞內信號傳導及共刺激信號傳導域可以任何順序串聯連接至跨膜域之羧基端。

【0079】 儘管經工程改造以含有來自CD3或FcR $\gamma$ 之信號傳導域的基於scFv之CAR已經顯示遞送用於T細胞活化及效應功能之強效信號，在不存在伴隨共刺激信號之情況下，其不足以引起促使T細胞存活及擴增的信號。含有結合域、鉸鏈、跨膜、及信號傳導域之其他CAR與一或多個共刺激信號傳導域（例如衍生自4-1BB、CD28、CD137、CD134、及CD278之胞內共刺激域）一起可更有效地引導抗腫瘤活性以及在體外、及動物模型及癌症患者中增加CAR表現性T細胞中之細胞介素分泌、裂解活性、存活、及增生(Milone et al., *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., *PNAS*, 2009; 106:3360-3365)。

【0080】 「共刺激信號(costimulatory signal)」係指與初級信號（諸如TCR/CD3連接）組合之信號引起T細胞反應，諸如但不限於關鍵分子之增生及/或上調或下調。

【0081】 「共刺激配體(costimulatory ligand)」包括特異性結合T細胞上之同源共刺激分子的抗原呈現細胞上之分子。共刺激配體之結合提供介導T細胞反應之信號，包括但不限於增生、活化、分化、及類似者。除了刺激分子所提供之初級信號外，共刺激配體亦藉由T細胞受體(TCR)/CD3複合物與裝載肽之主要組織相容性複合體(MHC)分子的結合誘導信號。共刺激配體可包括但不限於3/TR6、4-1BB配體、結合鐸(Toll)配體受體之促效劑或抗體、B7-1 (CD80)、

B7-2 (CD86)、CD30配體、CD40、CD7、CD70、CD83、疱疹病毒進入介導物 (herpes virus entry mediator, HVEM)、人類白血球抗原G (HLA-G)、ILT4、免疫球蛋白樣轉錄本(ILT) 3、可誘導型共刺激配體(ICOS-L)、細胞間黏附分子(ICAM)、與B7-H3特異性結合之配體、淋巴毒素β受體、MHC I類鏈相關蛋白A (MICA)、MHC I類鏈相關蛋白B (MICB)、OX40配體、PD-L2、或程式性死亡(PD)-L1。共刺激配體包括但不限於與存在於T細胞上之共刺激分子特異性結合之抗體，諸如但不限於4-1BB、B7-H3、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD7、ICOS、與CD83特異性結合之配體、淋巴球功能相關抗原1 (LFA-1)、自然殺手細胞受體C (NKG2C)、OX40、PD-1、或腫瘤壞死因子超家族成員14 (TNFSF14或LIGHT)。

【0082】 「共刺激分子(costimulatory molecule)」係與共刺激配體特異性結合之T細胞上之同源結合夥伴(partner)，從而介導T細胞之共刺激反應，諸如但不限於增生。共刺激分子包括但不限於「共刺激分子」係與共刺激配體特異性結合之T細胞上之同源結合夥伴，從而介導T細胞之共刺激反應，諸如但不限於增生。共刺激分子包括但不限於4-1BB/CD137、B7-H3、BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD33、CD45、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD134、CD137、CD154、CD16、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD19a、CD2、CD22、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3 (α; β; δ; ε; γ; ζ)、CD30、CD37、CD4、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD5、CD64、CD69、CD7、CD80、CD83配體、CD84、CD86、CD8α、CD8β、CD9、CD96 (Tactile)、CD1-1a、CD1-1b、CD1-1c、CD1-1d、CDS、CEACAM1、CRT AM、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fcγ受體、GADS、GITR、HVEM

(LIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、ICOS、Ig $\alpha$  (CD79a)、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、整合素、ITGA4、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、LFA-1、LIGHT、LIGHT (腫瘤壞死因子超家族成員14; TNFSF14)、LTBR、Ly9 (CD229)、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1 (CD11a/CD18)、MHC I類分子、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、OX40、PAG/Cbp、PD-1、PSGL1、SELPLG (CD162)、信號傳導淋巴球性活化分子、SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3)、SLAMF4 (CD244; 2B4)、SLAMF6 (NTB-A; Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNF、TNFr、TNFR2、鐳配體受體、TRANCE/RANKL、VLA1、或VLA-6、或其片段、截短、或組合。

**【0083】** 「保守性胺基酸取代(conservative amino acid substitution)」係其中胺基酸殘基被具有類似側鏈之胺基酸殘基置換者。所屬技術領域中已定義具有側鏈之胺基酸殘基之家族。此等家族包括具有鹼性側鏈之胺基酸 (例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈 (例如天冬胺酸、麩胺酸)、未帶電極性側鏈 (例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈 (例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、 $\beta$ -支鏈側鏈 (例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)、及芳族側鏈 (例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。在某些實施例中，抗體或其抗原結合分子之 (多個) CDR內或 (多個) 架構區內的一或多個胺基酸殘基可用具有類似側鏈之胺基酸殘基置換。通常而言，若兩個序列在對應位置中含有保守性胺基酸取代，則通常將該兩個序列視為「實質上類似的 (substantially similar)」。舉例而言，某些胺基酸通常分類為「疏水性

(hydrophobic)」或「親水性(hydrophilic)」胺基酸，及/或具有「極性(polar)」或「非極性(non-polar)」側鏈。用一個胺基酸取代相同類型的另一胺基酸可視為保守性取代。例示性胺基酸分類概述於以下表2及表3中：

表2

胺基酸	3 字母	1 字母	性質	性質	疏水性指數
丙胺酸	Ala	A	非極性	中性	1.8
精胺酸	Arg	R	極性	陽性	-4.5
天冬醯胺酸	Asn	N	極性	中性	-3.5
天冬胺酸	Asp	D	極性	陰性	-3.5
半胱胺酸	Cys	C	非極性	中性	2.5
麩胺酸	Glu	E	極性	陰性	-3.5
麩醯胺酸	Gln	Q	極性	中性	-3.5
甘胺酸	Gly	G	非極性	中性	-0.4
組胺酸	His	H	極性	陽性	-3.2
異白胺酸	Ile	I	非極性	中性	4.5
白胺酸	Leu	L	非極性	中性	3.8
離胺酸	Lys	K	極性	陽性	-3.9
甲硫胺酸	Met	M	非極性	中性	1.9
苯丙胺酸	Phe	F	非極性	中性	2.8
脯胺酸	Pro	P	非極性	中性	-1.6
絲胺酸	Ser	S	極性	中性	-0.8
蘇胺酸	Thr	T	極性	中性	-0.7
色胺酸	Trp	W	非極性	中性	-0.9
酪胺酸	Tyr	Y	極性	中性	-1.3
纈胺酸	Val	V	非極性	中性	4.2

表3

不明確胺基酸	3 字母	1 字母
天冬醯胺酸或天冬胺酸	Asx	B
麩醯胺酸或麩胺酸	Glx	Z
白胺酸或異白胺酸	Xle	J
未指定或未知之胺基酸	Xaa	X

**【0084】** 「組合療法(combination therapy)」係指對象同時暴露於二或更多個治療方案（例如二或更多種治療部分）之彼等情況。在一些實施例中，二或更多個方案可同時投予；在一些實施例中，可依序投予此類方案（例如第一方案之所有「劑量(dose)」係在投予任何劑量之第二方案之前投予）；在一些實施例中，此類藥劑以重疊給藥方案投予。在一些實施例中，組合療法之「投予(administration)」可涉及對接受在組合中之其他藥劑或療法之對象投予一或多種藥劑或療法。為清楚起見，組合療法不需要將個別藥劑在單一組成物中一起投予（或甚至不需要同時），儘管在一些實施例中，二或更多種藥劑或其活性部分可在組合組成物中一起投予，或甚至在組合化合物中投予（例如作為單一化學複合物或共價實體之一部分）。

**【0085】** 「對應於(corresponding to)」可用以藉由與適當之參考分子或組成物比較，指定分子或組成物中之結構元件之位置/身分。例如，在一些實施例中，聚合物中之單體殘基（例如多肽中之胺基酸殘基或多核苷酸中之核酸殘基）可識別為「對應於」在適當之參考聚合物中之殘基。舉例而言，針對簡單起見之目的，多肽中之殘基可使用基於參考相關多肽之標準編號系統指定，使得在位置100處「對應於」殘基之胺基酸（例如不需要實際上為所提供胺基酸鏈中之第100個胺基酸），其對應於在參考多肽中之位置100處發現之殘基。各

種序列比對策略係可用的，包含軟體程式，諸如例如BLAST、CS-BLAST、CUDASW++、DIAMOND、FASTA、GGSEARCH/GLSEARCH、Genoogle、HMMER、HHpred/HHsearch、IDF、Infernal、KLAST、USEARCH、parasail、PSI-BLAST、PSI-Search、ScalaBLAST、Sequilab、SAM、SSEARCH、SWAPHI、SWAPHI-LS、SWIMM、或SWIPE，其可用於例如根據本揭露識別多肽及/或核酸中之「對應」殘基。

**【0086】** 若抗原與第一抗原結合分子之間的交互作用阻擋、限制、抑制、或以其他方式降低參考結合分子與抗原交互作用之能力，則抗原結合分子（諸如抗體、其抗原結合片段、CAR、或TCR）與參考結合分子（諸如抗體或其抗原結合片段）「交叉競爭(cross-compete)」。交叉競爭可完成，例如抗原結合分子與抗原之結合完全阻斷參考結合分子與抗原結合之能力，或其可為部分的，例如抗原結合分子與抗原之結合降低參考抗原結合分子與抗原結合之能力。在某些實施例中，與參考抗原結合分子交叉競爭之抗原結合分子結合與參考抗原結合分子相同或重疊之表位。在其他實施例中，與參考抗原結合分子交叉競爭之抗原結合分子結合與參考抗原結合分子不同之表位。許多類型之競爭結合檢定可用以判定一種抗原結合分子是否與另一種競爭，例如：固相直接或間接放射免疫檢定(RIA)；固相直接或間接酶免疫檢定(EIA)；夾心競爭檢定 (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253)；固相直接生物素抗生物素蛋白EIA (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619)；固相直接標記檢定，固相直接標記之夾心檢定(Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press)；使用<sup>125</sup>I標記之固相直接標記RIA (Morel et al., 1988, *Molec.Immunol.* 25:7-15)；固相直接生物素抗生物素蛋白EIA (Cheung,

et al., 1990, *Virology* 176:546-552)；及直接標示之RIA (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)。

**【0087】** 「細胞介素(cytokine)」係指藉由一個細胞回應於與特定抗原接觸而釋放之非抗體蛋白質，其中細胞介素與第二細胞交互作用以介導第二細胞中之反應。細胞介素可藉由胞內源性表現或向對象投予。細胞介素可由免疫細胞（包括巨噬細胞、B細胞、T細胞、及肥大細胞）釋放而傳播免疫反應。細胞介素可誘導接受者細胞中之各種反應。細胞介素可包括體內恆定細胞介素、趨化因子、促炎性細胞介素、效應物、及急性期蛋白。例如，包括介白素(IL) 7及IL-15之體內恆定(homeostatic)細胞介素促進免疫細胞存活及增生，且促炎性細胞介素可促進發炎性反應。體內恆定細胞介素之實例包括但不限於IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-15、及干擾素(IFN)  $\gamma$ 。促發炎細胞介素之實例包括但不限於IL-1a、IL-1b、IL-6、IL-13、IL-17a、腫瘤壞死因子(TNF)- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、纖維母細胞生長因子(FGF) 2、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、可溶細胞間黏附分子1 (sICAM-1)、可溶血管黏附分子1 (sVCAM-1)、血管內皮生長因子(VEGF)、VEGF-C、VEGF-D、及胎盤生長因子(PLGF)。效應物之實例包括但不限於顆粒酶A、顆粒酶B、可溶性Fas配體(sFasL)、及穿孔素。急性期蛋白之實例包括但不限於C反應蛋白(CRP)及血清類澱粉蛋白A (SAA)。

**【0088】** 「減少(decrease)」、或「減低(lower)」、或「減輕(lessen)」、或「降低(reduce)」、或「消滅(abate)」通常係指相較於由單獨媒劑（亦即活性部份）或對照分子/組成物造成之反應，本文所設想之組成物產生、引發、或造成較小生理反應（亦即下游效應）之能力。「減少」或「降低」量一般係「統

計學上顯著的(statistically significant)」量，且可包括下列之1.1、1.2、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、15、20、30或更多倍（例如500、1000倍）的減少（包括介於之間及大於1之所有整數及小數點，例如1.5、1.6、1.7、1.8等）：由媒劑、對照組成物產生之反應（參考反應）。

**【0089】** 用語「域(domain)」係指一實體之一部分。在一些實施例中，「域」與實體之結構及/或功能性特徵相關聯，例如使得當域實體與其親本實體之其餘部分分離時，其實質上或完全保留結構及/或功能特徵。在一些實施例中，域可包含實體之一部分，當與（親本）實體分離且與不同（接收者）實體鏈接或連接時，實質上保留及/或賦予接收者實體一或多個結構及/或功能特徵，例如其在親本實體中之特徵。在一些實施例中，域係分子之一部分（例如小分子、碳水化合物、脂質、核酸、或多肽）。在一些實施例中，域係多肽之區段；在一些此類實施例中，域之特徵在於結構元件（例如胺基酸序列或序列模體、 $\alpha$ -螺旋性狀、 $\beta$ -薄片性狀、捲曲線圈性狀、隨機線圈性狀等），及/或功能性特徵（例如結合活性、酶活性、摺疊活性、信號傳導活性等）。

**【0090】** 用語「劑型(dosage form)」可用以指投予至對象之活性劑之物理離散單元（例如抗原結合系統或抗體）。一般而言，各此類單元含有預定量之活性劑。在一些實施例中，此類量係根據已判定當向相關群體投予時與所期望或有益結果相關之給藥方案之適於投予之單位劑量（或其全部部分）。向對象投予之治療組成物或藥劑之總量由一或多個醫學醫師判定，且可涉及投予超過一種劑型。

**【0091】** 用語「給藥方案(dosing regimen)」可用於指一組一或多個單位劑量，該組一或多個單位劑量係個別投予至對象。在一些實施例中，給定治療劑具有推薦劑量方案，其可涉及一或多種劑量。在一些實施例中，給藥方案包含複數個劑量，其各者在時間上與其他劑量分開。在一些實施例中，給藥方案包含複數個劑量且連續劑量藉由相等長度之時段彼此分離；在一些實施例中，給藥方案包含複數個劑量且連續劑量藉由至少兩個不同長度之時段彼此分離。在一些實施例中，給藥方案內之所有劑量係相同單位劑量。在一些實施例中，給藥方案內不同劑量係不同量。在一些實施例中，給藥方案包含第一劑量之第一劑量，隨後係不同於第一劑量之第二劑量之一或多個額外劑量。在一些實施例中，週期性調整給藥方案以達成所欲或有益結果。

**【0092】** 「效應細胞(effector cell)」係指表現一或多種Fc受體且介導一或多種效應功能之免疫系統之細胞。在一些實施例中，效應細胞可包含但不限於單核球、巨噬細胞、嗜中性球、樹突細胞、嗜酸性球、肥大細胞、血小板、大顆粒淋巴球、蘭格罕細胞(Langerhans' cell)、自然殺手(NK)細胞、T淋巴球、及B淋巴球中之一或多者。效應細胞可屬於任何生物體，包含但不限於人類、小鼠、大鼠、兔、及猴。

**【0093】** 「效應功能(effector function)」係指抗體Fc區與Fc受體或配體交互作用之生物結果。效應功能包含但不限於抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、抗體依賴性細胞介導之吞噬作用(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP)、及補體介導之細胞毒性(complement-mediated cytotoxicity, CMC)。效應功能可係抗原結合依賴性、抗原結合獨立性、或兩者。ADCC係指藉由免疫效應細胞裂解抗體結合之

目標細胞。不希望受任何理論束縛，ADCC通常理解為涉及辨識及隨後殺滅抗體塗佈之目標細胞之Fc受體(FcR)攜帶效應細胞（例如表現在抗體結合之表面抗原上之細胞）。介導ADCC之效應細胞可包含免疫細胞，其包含但不限於自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞、嗜中性球、嗜酸性球中之一或多者。

**【0094】** 「表位(epitope)」係指抗體可特異性結合之抗原的局部區域。

表位可係例如多肽（線性或連續表位）之連續胺基酸，或表位可例如一起來自一或多個多肽之二或更多個非連續區域（構形、非線性、不連續、或非連續表位）。在某些實施例中，抗體結合之表位可藉由例如NMR光譜術、X射線繞射結晶學研究、ELISA檢定、與質譜測定術交換耦合之氫/氘（例如液相層析電噴霧質譜測定術）、基於陣列之寡肽掃描檢定、及/或突變誘發映射（例如位點引導之突變誘發映射）。對於X射線結晶學，可使用所屬技術領域中已知方法中之任一者來實現結晶（例如Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350；McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23；Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274；McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303）。抗體：抗原結晶，可使用熟知之X射線繞射技術研究，且可使用電腦軟體改良，諸如X-PLOR（Yale University, 1992, distributed by Molecular Simulations, Inc.；參見例如Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*,; U.S. 2004/0014194）、及BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323)。突變誘發映射研究可使用所屬技術領域中具有通常知識者已知之任何方法實現。參見例如Champe M *et al.*, (1995) *J Biol*

Chem 270: 1388-1394 and Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085 針對突變誘發技術之描述，包括丙胺酸掃描突變誘發技術。

【0095】 參考基因、蛋白質、及/或核酸之「內源性(endogenous)」係指基因、蛋白質、及/或核酸在細胞（諸如免疫細胞）中之天然存在。

【0096】 「外源(exogenous)」係指引入細胞之藥劑，諸如核酸、基因、或蛋白質，例如來自外部源。即使其編碼在細胞中天然存在之蛋白質，引入細胞中之核酸係外源。此類外源引入編碼蛋白質之核酸可用以增加蛋白質之表現，使其超過在類似條件下（例如未引入外源核酸）自然存在於細胞中之水平。

【0097】 用語「賦形劑(excipient)」係指可包含在組成物中之藥劑，例如用以提供或促進所欲的同一性或穩定化效應。在一些實施例中，適合的賦形劑可包含例如澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、大米、麵粉、白土粉、矽膠、硬脂酸鈉、甘油單硬脂酸酯、滑石、氯化鈉、乾燥之脫脂牛奶、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇、或類似物。

【0098】 如本文所述之材料或實體之「片段(fragment)」或「部分(portion)」具有包含整個例如物理實體或抽象實體之離散部分之結構。在一些實施例中，片段缺乏整個發現之一或多個部分。在一些實施例中，片段由整個發現之特性結構元件、域或部分所組成，或包含其等。在一些實施例中，聚合物片段包含如在整個聚合物中發現之至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、

400、425、450、475、500或更多個單體單元（例如殘基），或由其等所組成。在一些實施例中，聚合物片段包含在整個聚合物中發現之單體單元（例如殘基）之至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、25%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多或由其等所組成（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）。在一些實施例中，整個材料或實體可稱為片段之「親本(parent)」。

**【0099】** 用語「融合多肽(fusion polypeptide)」或「融合蛋白(fusion protein)」通常係指包含至少兩個區段之多肽。一般而言，含有至少兩個此類區段之多肽在下列情況下被視為融合多肽，若兩個區段係下列之部分：(1)非天然包含在相同肽中，及/或(2)先前未在單一多肽中鏈接或連接至彼此，及/或(3)已透過女/男人手之作動而鏈接或連接至彼此。在實施例中，CAR係融合蛋白。

**【0100】** 用語「基因產物(gene product)」或「表現產物(expression product)」通常係指由基因（預先及/或後處理）轉錄之RNA，或由基因轉錄之RNA編碼之多肽（預先及/或後修飾）。

**【0101】** 用語「經基因工程改造(genetically engineered)」或「經工程改造(engineered)」係指修飾細胞基因體之方法，其包括但不限於缺失編碼或非編碼區或其部分、或插入編碼區或其部分。在一些實施例中，經修飾之細胞係淋巴球（例如T細胞），其可獲自患者或捐贈者。細胞可經修飾以表現外源建構體，諸如例如嵌合抗原受體(CAR)，其併入至細胞基因體中。工程改造通常包含人手操縱。舉例而言，當二或更多個序列在自然界中未依此順序鏈接或連接，而係經人手操縱而直接鏈接或連接至彼此時，將多核苷酸視為「經工程改

造」。在藉由分子生物學技術操縱細胞之背景下，若細胞或生物體已經操縱使其基因資訊被改變（例如已引入先前不存在之新基因物質，例如藉由轉化、體細胞雜交、轉染、轉導、電穿孔、或其他機制，或改變或移除先前存在之基因物質，例如藉由取代或缺失突變、或藉由其他規程），則將該細胞或生物體視為「經工程改造」。在一些實施例中，結合劑係經修飾之淋巴球，例如T細胞可獲自患者或捐贈者。經工程改造之細胞可經修飾以表現外源構築體，諸如例如嵌合抗原受體(CAR)，其併入至細胞基因體中。經工程改造之多核苷酸或結合劑之後代通常稱為「經工程改造」，即使實際操縱在先前實體上進行。在一些實施例中，「經工程改造」係指已經設計及產生之實體。用語「經設計(designed)」係指藥劑(i)其結構係或經人手選擇；(ii)由需要人手之方法產生；及/或(iii)與天然物質及其他已知藥劑相異。

**【0102】** 「T細胞受體」或「TCR」係指存在於T細胞表面上之抗原識別分子。在正常T細胞發展期間，四個TCR基因 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、及 $\delta$ 之各者可重新排列導致高度不同之TCR蛋白質。在實施例中，本文所揭示之T細胞已經工程改造以減少、消除、及/或抑制TCR受體之 $\alpha$ 鏈之表面表現。

**【0103】** 用語「異源(heterologous)」意指來自非天然存在之序列的任何來源。例如，作為共刺激蛋白質之一部分包括的異源序列係非天然存在之胺基酸，亦即與野生型人類共刺激蛋白質不一致。例如，異源核苷酸序列係指野生型人類共刺激蛋白質編碼序列以外的核苷酸序列。

**【0104】** 用語「同一性(identity)」係指聚合分子之間的整體相關性，例如在核酸分子之間（例如DNA分子及/或RNA分子）及/或多肽分子之間。與兩個所提供之多肽序列之間的同一性百分比計算的方法係已知的。例如可藉由比

對二個序列以用於最佳比較目的來執行兩個核酸或多肽序列之同一性百分比之計算（例如可在第一及第二序列中之一或兩者中引入間隙以用於最佳比對，且可出於比較目的忽略非同一性序列）。接著比較對應位置處之核苷酸或胺基酸。當第一序列中之位置被與第二序列中之對應位置同一之殘基（例如核苷酸或胺基酸）佔據時，則分子在彼位置處係同一的。兩個序列之間的同一性百分比係序列共有的相同位置數目之函數，其可選地考慮間隙數目及各間隙之長度，可能需要引入間隙以達到兩個序列之最佳比對。可使用數學演算法（諸如BLAST（基本局部比對搜尋工具））實現序列之比較或比對及兩個序列之間的同一性百分比之判定。在一些實施例中，若其序列係至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或99%同一（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），則聚合分子視為彼此「同源」。

**【0105】** 為了計算同一性百分比，被比較之序列一般係以給予序列之間最大匹配的方式比對。可用於判定同一性百分比的電腦程式之一個實例係GCG程式套件，其包括GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)。電腦演算法GAP係用於比對兩個多肽或多核苷酸，以判定其等之序列同一性百分比。序列針對其各別胺基酸或核苷酸之最佳匹配進行比對（如由演算法判定之「匹配跨度 (matched span)」）。在某些實施例中，標準比較矩陣（參見Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 for the BLOSUM 62 comparison matrix）亦由演算法使用。其他演算法亦可用於胺基酸

或核苷酸序列之比較，包含在商業電腦程式中可用的演算法，諸如用於核苷酸序列之BLASTN及用於胺基酸序列之BLASTP、gapped BLAST、及PSI-BLAST。例示性的此類程式描述於Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990；Altschul, et al., Methods in Enzymology；Altschul, et al., “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs,” Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997；Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998；及Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999。除識別類似序列之外，上文所提及之程式通常提供相似性程度之指示。在一些實施例中，兩個序列視為實質上相似若至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、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%或更多其對應殘基在殘基之相關延伸係相似及/或同一（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）。在一些實施例中，相關延伸係完整序列。在一些實施例中，相關延伸係至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100、至少125、至少150、至少175、至少200、至少225、至少250、至少275、至少300、至少325、至少350、至少375、至少400、至少425、至少450、至少475、至少500或更多殘基。具有實質序列類似性之序列可彼此同源。

**【0106】** 當提及核酸或其片段時，用語「實質同一性(substantial identity)」或「實質上同一(substantially identical)」指示當與另一核酸（或其互補股）以適當核苷酸插入或缺失進行最佳比對時，在至少約95%（且更佳地至少約96%、97%、98%、或99%）的核苷酸鹼基中有核苷酸序列同一性，如由序列同一性之任何熟知演算法所測量，諸如FASTA、BLAST、或Gap，如以下所論述。在某些情況下，具有與參考核酸分子實質同一性之核酸分子可編碼具有與參考核酸分子編碼之多肽相同或實質上類似之胺基酸序列之多肽。

**【0107】** 如應用於多肽，用語「實質類似性(substantial similarity)」或「實質上類似(substantially similar)」意指兩個肽序列當最佳比對（諸如藉由程式GAP或BESTFIT使用預設間隙權重）時，共有至少95%序列同一性，甚至更佳地至少98%或99%序列同一性。較佳地，不同一之殘基位置與保守胺基酸取代不同。

**【0108】** 用語「改善(improve)」、「增加(increase)」、「抑制(inhibit)」、及「減少(reduce)」指示相對於基線或其他參考測量之值。在一些實施例中，適當的參考測量可包含在某些系統中的測量（例如在一單個個體中），在其他可比情況下，不存在（例如之前及/或之後）藥劑或治療，或存在適當的可比參考藥劑。在一些實施例中，適當的參考測量可包含在相關劑或治療存在下對所已知或預期的相當系統以相當的方式反應之測量結果。

**【0109】** 「免疫反應(immune response)」係指免疫系統細胞（例如，T淋巴球、B淋巴球、自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞、嗜酸性球、肥大細胞、樹突細胞、及嗜中性球）及由任何這些細胞或肝臟所生產之可溶巨分子（包括Ab、細胞介素、及補體）的作用，其會導致對脊椎動物體內之侵犯病原體、受病原

體所感染之細胞或組織、癌性或其他異常細胞、或（在自體性或病理性發炎之情況下）正常人類細胞或組織的選擇性靶向、結合、損傷、破壞、及/或消除。

**【0110】** 用語「免疫療法(immunotherapy)」係指罹患疾病、或有感染疾病或遭受疾病再發之風險的對象藉由包含誘導、增強、抑制、或以其他方式修改免疫反應之方法的治療。免疫療法之實例包括但不限於NK細胞、iNKT細胞、及T細胞療法。T細胞療法可包括過繼性T細胞療法、腫瘤浸潤淋巴球(TIL)免疫療法、自體細胞療法、經工程改造之自體細胞療法(eACT™)、及同種異體T細胞移植。T細胞療法之實例描述於美國專利公開案第2014/0154228號及第2002/0006409號、美國專利第5,728,388號、及國際專利公開案WO 2008/081035。

**【0111】** 免疫療法之T細胞可來自所屬技術領域中已知之任何來源。例如，T細胞可在體外自造血幹細胞群體分化、或可獲自對象，例如在工程改造後移植至第二對象中。T細胞可得自例如周邊血液單核細胞(PBMC)、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染部位之組織、腹水、胸膜積水、脾臟組織、及腫瘤。此外，T細胞可衍生自所屬技術領域中可用之一或多種T細胞系。T細胞亦可使用所屬技術領域中具有通常知識者已知之任何數量之技術，諸如FICOLL™分離及/或血球分離來自對象收集之血液之單位獲得。T細胞療法單離T細胞之額外方法揭示於美國專利公開案第2013/0287748號，其以全文以引用方式併入本文中。

**【0112】** 用語「體外(in vitro)」係指在一人工環境中發生的事件，例如在測試管、反應容器、細胞培養等中，而非在多細胞生物體內。用語「體外細胞(in vitro cell)」係指離體培養之任何細胞。特定而言，體外細胞可包括T細

胞。用語「體內(in vivo)」係指在多細胞生物體（諸如人類或非人類動物）內發生之事件。

**【0113】** 用語「單離(isolated)」係指一種物質，其：(1)已自至少一些組分分離，其中其與該物質在較早時間締合或該物質將以其他方式與其相關聯，及/或(2)存在於組成物中，該組成物包含一或多種已知或未知污染物之限制或限量或濃度。在一些實施例中，經單離物質可自約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、或超過約99%（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）之其他非物質組分分離，其與該物質在較早時間相關聯，例如該物質先前或以其他方式將與其他組分或污染物相關聯。在某些情況下，若物質存在於包含相同或類似類型之分子之限制或降低量或濃度之組成物中，則單離物質。舉例而言，在某些情況下，若核酸、DNA、或RNA物質存在於包含限制或降低量或濃度之非物質核酸、DNA、或RNA分子之組成物中，則單離核酸、DNA、或RNA物質。舉例而言，在某些情況下，若多肽物質存在於包含限制或降低量或濃度之非物質多肽分子之組成物中，則單離多肽物質。在某些實施例中，量可係例如相對於在組成物中存在之所欲物質所測量之量。在某些實施例中，有限量可係組成物中之物質不超過100%之量，例如不超過1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或95%之組成物中之物質（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）。在某些情況下，組成物相對於所選擇物質係純的或實質上純的。在一些實施例中，經單離物質係約80%、約85%、約90%、約

91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、或超過約99%之純（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）。若其實質上不含其他組分或污染物，則物質係「純」。在一些實施例中，物質仍可被視為「經單離」或甚至「純」，在其已與某些其他組分諸如，例如一或多個載劑或賦形劑（例如緩衝劑、溶劑、水等）組合之後；在此類實施例中，在不包含此類載劑或賦形劑之情況下計算物質之單離百分比或純度。

**【0114】** 「連接子(linker)」(L)或「連接子域(linker domain)」或「連接子區(linker region)」係指例如長度約1至100個胺基酸之寡肽或多肽區，其將CAR、及/或scFv之域/區中之任一者連接在一起，或甚至將這些多肽中之一或多者連接在一起。連接子可由可撓性殘基（如甘胺酸及絲胺酸）構成，使得相鄰的蛋白質域可以相對於彼此自由移動。當確保兩個相鄰域不會在空間上彼此干擾係所欲時，可使用較長連接子。連接子可係可裂解或不可裂解。可裂解連接子之實例包括2A連接子（例如T2A）、2A樣連接子或其功能等效物及其組合。對所屬技術領域中具有通常知識者而言其他連接子將顯而易見，且可與本揭露結合使用。連接子可係多元素劑之一部分，其將不同元件彼此連接。舉例而言，多肽包括二或更多個功能或結構域可包含在彼此連接之此類域之間的胺基酸之延伸。在一些實施例中，包含連接子元件之多肽具有通常形式S1-L-S2之總結構，其中S1及S2可係相同或不同且表示藉由連接子彼此相關聯之兩個域。在一些實施例中，多肽連接子之長度係至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100

或更多個胺基酸（例如長度係1至10、1至20、1至30、1至40、1至50、1至60、1至70、1至80、1至90、1至100、10至20、10至30、10至40、10至50、10至60、10至70、10至80、10至90、或10至100個胺基酸）。在一些實施例中，連接子之特徵在於其傾向不採用剛性三維結構，且替代地提供多肽之靈活性。在另一實例中，其可用於連接至或更多待表現之多肽。其他連接子包括非可裂解連接子。使用數個連接子來實現本發明，包括「可撓性連接子」。後者富含甘胺酸。Klein et al., *Protein Engineering, Design & Selection* Vol. 27, No. 10, pp. 325–330, 2014; Priyanka et al., *Protein Sci.*, 2013 Feb; 22(2): 153–167。

**【0115】** 在一些實施例中，連接子係合成連接子。合成連接子可具有約10個胺基酸至約200個胺基酸之長度，例如10至25個胺基酸、25至50個胺基酸、50至75個胺基酸、75至100個胺基酸、100至125個胺基酸、125至150個胺基酸、150至175個胺基酸、或175至200個胺基酸。合成連接子可具有10至30個胺基酸之長度，例如10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30個胺基酸。合成連接子可具有30至50個胺基酸之長度，例如30至35個胺基酸、35至40個胺基酸、40至45個胺基酸、或45至50個胺基酸。

**【0116】** 在一些實施例中，連接子係可撓性連接子。在一些實施例中，連接子富含甘胺酸（Gly或G）殘基。在一些實施例中，連接子富含絲胺酸（Ser或S）殘基。在一些實施例中，連接子富含甘胺酸及絲胺酸殘基。在一些實施例中，連接子具有一或多種甘胺酸-絲胺酸殘基(GS)對，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10或更多個GS對。

**【0117】** 用語「淋巴球(lymphocyte)」包括自然殺手(NK)細胞、T細胞、iNKT細胞、或B細胞。NK細胞係代表固有免疫系統之組分的細胞毒性淋巴球之一種類型。NK細胞會除去腫瘤及受病毒感染之細胞。其透過細胞凋亡或程式性細胞死亡之程序發揮作用。其等之所以稱為「自然殺手」是因為不需要活化即可殺滅細胞。T細胞在細胞介導之免疫性中起作用（無抗體參與）。其T細胞受體(TCR)是自其他淋巴球類型使自身分化出來。胸腺（免疫系統之特化器官）主要負責T細胞之成熟。有六種類型之T細胞，亦即：輔助T細胞（例如CD4+細胞）、細胞毒性T細胞（亦稱為TC、細胞毒性T淋巴球、CTL、T-殺手細胞、細胞毒性T細胞、CD8+ T細胞或殺手T細胞）、記憶T細胞（(i)幹記憶T<sub>SCM</sub>細胞，類似初級細胞，係CD45RO<sup>-</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>（L-選擇素）、CD27<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、及IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>、但其亦表現大量CD95、IL-2R $\beta$ 、CXCR3及LFA-1，且展示記憶體細胞特有之多種功能屬性）；(ii)中央記憶T<sub>CM</sub>細胞，表現L-選擇素及CCR7，其分泌IL-2但不為IFN $\gamma$ 或IL-4，及(iii)效應記憶T<sub>EM</sub>細胞，然而，不表現L-選擇素或CCR7，但產生類似IFN $\gamma$ 及IL-4之效應細胞介素）、調節T細胞（Treg、抑制T細胞、或CD4+CD25+調節T細胞）、自然殺手T細胞(NKT)、及 $\gamma\delta$ T細胞。另一方面，B細胞在體液免疫中起作用（具有抗體參與）。其製造抗體及抗原且扮演抗原呈現細胞(APC)之角色，且在由抗原交互作用活化之後轉變為記憶B細胞。在哺乳動物中，未成熟B細胞係在骨髓中形成，因而得到其名稱。

**【0118】** 用語「中和(neutralizing)」係指結合至配體且防止或降低該配體之生物效應的抗原結合分子、scFv、抗體、或其片段。在一些實施例中，抗原結合分子、scFv、抗體、或其片段直接阻斷配體上之結合位點，或以其他方式

透過間接手段（諸如配體中之結構或能量改變）改變配體之結合能力。在一些實施例中，抗原結合分子、scFv、抗體、或其片段防止其所結合之蛋白質執行生物功能。

**【0119】** 「核酸(nucleic acid)」係指核苷酸之任何聚合鏈。核酸可係DNA、RNA、或其組合。在一些實施例中，核酸包含一或多種天然核酸殘基。在一些實施例中，核酸包含一或多種核酸類似物。在一些實施例中，核酸係藉由從天然來源單離、藉由基於互補模板聚合之酶促合成（體內或體外）、在重組細胞或系統中再生、及化學合成中之一或多者來製備。在一些實施例中，核酸係至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000或更多個殘基長（例如20至100、20至500、20至1000、20至2000、或20至5000或更多個殘基）。在一些實施例中，核酸係部分或全單股；在一些實施例中，核酸係部分或全雙股。在一些實施例中，核酸具有包含編碼多肽或係編碼多肽之序列的補體之至少一個元件之核苷酸序列。

**【0120】** 「可操作地連接(operably linked)」係指其中所述組分處於允許其等以其預期方式起作用之關係中之鄰接位置。例如，控制元件「可操作地連接」至功能元件係以在相容的條件下達成功能元件之表現及/或活性的方式與該控制元件相關聯。

**【0121】** 「患者(patient)」包括患有癌症（例如前列腺癌）之任何人類。用語「對象(subject)」及「患者」在本文中可互換使用。

**【0122】** 用語「肽(peptide)」、「多肽(polypeptide)」、及「蛋白質(protein)」可互換使用，且係指包含由肽鍵共價連接之胺基酸殘基的化合物。蛋白質或肽含有至少兩個胺基酸，且對可包含蛋白質或肽序列之胺基酸的最大數目沒有限制。多肽包括包含彼此由肽鍵所接合之二或更多個胺基酸的任何肽或蛋白質。如本文中所使用，該用語係同時指短鏈（在所屬技術領域中亦經常稱為例如肽、寡肽、及寡聚物）及長鏈（在所屬技術領域中通常稱為蛋白質，而蛋白質有許多類型）。「多肽」包括例如生物活性片段、實質上同源之多肽、寡肽、同二聚體、異二聚體、多肽之變體、經修飾多肽、衍生物、類似物、融合蛋白等。多肽包括自然肽、重組肽、合成肽、或其組合。

**【0123】** 用語「醫藥上可接受(pharmaceutically acceptable)」係指分子或組成物當向接受者投予時，對其接受者無害，或對其接受者的益處超過任何有害效應。關於用於調配如本文所揭示之組成物的載劑、稀釋劑、或賦形劑，醫藥上可接受之載劑、稀釋劑、或賦形劑必須與組成物之其他成分相容且對其接受者無害，或對接受者的益處必須超過任何有害效應。用語「醫藥上可接受之載劑(pharmaceutically acceptable carrier)」意指醫藥上可接受之材料、組成物、或媒劑，諸如液體或固體填充劑、稀釋劑、賦形劑、或溶劑包封材料，其涉及將藥劑自身體之一個部分攜帶或運輸至另一部分（例如自一個器官至另一個）。在醫藥組成物中存在之各載體在與配方之其他成分相容之情況下必須係「可接受(acceptable)」，且對患者無害，或必須對接受者的益處超過任何有害效應。可作為醫藥上可接受之載劑的材料之一些實例包含：糖，諸如乳糖、葡萄糖、及蔗糖；澱粉，諸如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，諸如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素、及乙酸纖維素；粉末狀黃耆膠；麥芽；明膠；

滑石；賦形劑，諸如可可脂及栓劑蠟；油，諸如花生油、棉籽油、紅花子油、芝麻油、橄欖油、玉米油、及黃豆油；二醇，諸如丙二醇；多元醇，諸如甘油、山梨醇、甘露醇、及聚乙二醇；酯，諸如油酸乙酯及月桂酸乙酯；洋菜；緩衝劑，諸如氫氧化鎂及氫氧化鋁；藻酸；無致熱原的水；等張鹽水；林格氏液；乙醇；pH緩衝溶液；聚酯、聚碳酸酯及/或聚酞；及醫藥配方中採用的其他非毒性相容物質。

**【0124】** 用語「醫藥組成物(pharmaceutical composition)」係指其中活性劑與一或多種醫藥上可接受之載劑調配在一起之組成物。在一些實施例中，活性劑以適於治療方案中投予之單位劑量存在，該治療方案展示當向相關對象或群體投予時達成預定治療效果之統計顯著機率。在一些實施例中，醫藥組成物可經調配用於以固體或液體形式投予，包含但不限於適用於以下形式：經口投予，例如灌劑（水性或非水溶液或懸浮液）、錠劑（例如彼等目標用於口腔、舌下及全身性吸收）、用於施用至舌片之丸劑、粉末、顆粒、膏；腸胃外投予，例如藉由皮下、肌肉內、靜脈內或硬膜外注射作為例如無菌溶液或懸浮液或持續釋放配方；局部施用，例如作為乳膏、軟膏或控制釋放貼片、或施用至皮膚、肺或口腔之噴霧；陰道內或直腸內，例如作為栓劑、乳膏或泡沫；舌下；眼；經皮膚；或經鼻、肺及其他黏膜表面。

**【0125】** 用語「增生(proliferation)」係指細胞分裂之增加，細胞之對稱或不對稱分裂。在一些實施例中，「增生」係指T細胞之對稱或不對稱分裂。相較於未經處理之樣本中之細胞，當經處理樣本中之細胞數目增加時，發生「增生增加」。

**【0126】** 用語「參考(reference)」描述與其進行比較之標準或控制。舉例而言，在一些實施例中，將所關注之藥劑、動物、個體、群體、樣本、序列、或值與作為藥劑、動物、個體、群體、樣本、序列、或值之參考或對照相比較。在一些實施例中，將所關注之測試、測量或判定與參考或對照實質上同時測試、測量及/或判定。在一些實施例中，參考或對照係歷史參考或對照，該歷史參考或對照可選地實施在有形介質中。通常，參考或對照係在與評估對象相當的條件或情況下判定或表徵的。當存在足夠的相似性以證明對所選擇之參考或對照的依賴及/或比較是合理的。

**【0127】** 「調節T細胞(regulatory T cell)」(「Treg」、「Treg細胞」、或「Tregs」)係指參與控制某些免疫活性(例如自體免疫、過敏、及對感染之反應)之CD4+ T淋巴球譜系。調節T細胞可調節T細胞群之活性，且亦可影響某些先天性免疫系統細胞類型。Treg可藉由生物標記CD4、CD25、及Foxp3之表現及CD127之低表現識別。天然存在之Treg細胞通常構成約5%至10%周邊CD4+ T淋巴球。然而，腫瘤微環境內之Treg細胞(亦即腫瘤浸潤Treg細胞)，Treg細胞可能佔總CD4+ T淋巴球群之多達20至30%。

**【0128】** 用語「樣本(sample)」通常係指從所關注源獲得或衍生之材料之等分試樣。在一些實施例中，所關注源係生物或環境源。在一些實施例中，所關注來源可包含細胞或生物體，諸如細胞群、組織、或動物(例如人類)。在一些實施例中，所關注源包含生物組織或流體。在一些實施例中，生物組織或流體可包含羊水、房水、腹水、膽汁、骨髓、血液、乳汁、腦脊髓液、叮嚀、乳糜、繃、射精、內淋巴、滲出液、糞便、胃酸、胃液、淋巴液、黏液、心包液、外淋巴液、腹膜液、胸膜液、膿液、風濕液、唾液、皮脂、精液、血清、

包皮垢、痰液、滑液、汗液、淚液、尿液、陰道分泌物、玻璃狀液、嘔吐物、及/或其組合或組分。在一些實施例中，生物流體可包含胞內流體、胞外流體、靜脈內流體（血漿）、組織間隙液、淋巴液、及/或移植細胞流體。在一些實施例中，生物流體可包含植物滲出液。在一些實施例中，可獲得生物組織或樣本例如藉由抽吸、活體組織切片（例如細針或組織活體組織切片）、拭子（例如口腔、鼻、皮膚、或陰道拭子）、刮刀、手術、洗滌或灌洗（例如支氣管肺泡、導管、鼻、眼部、口腔、子宮、陰道、或其他洗滌或灌洗）。在一些實施例中，生物樣本包含獲自個體之細胞。在一些實施例中，樣本係藉由任何適當方式直接自所關注來源獲得之「初級樣本(primary sample)」。在一些實施例中，如從上下文中將清楚的，用語「樣本(sample)」係指藉由處理（例如藉由移除一或多種組分及/或藉由添加一或多種劑至）初級樣本而獲得的製劑。此類「經處理樣本」可包含例如核酸或蛋白質，其係萃取自樣本中或藉由使初級樣本經受一或多種技術而獲得，諸如核酸之擴增或反轉錄、某些組分之單離及/或純化等。

**【0129】** 「單鏈可變片段」、「單鏈抗體可變片段」或「scFv」抗體指包含僅藉由連接子肽連接之重鏈及輕鏈之可變區的抗體形式。

**【0130】** 用語「癌症分期(stage of cancer)」係指癌症進展程度之定性或定量評估。在一些實施例中，用於判定癌症之階段之標準可包含但不限於下列之一或多者：癌症在本體中之位置、腫瘤尺寸、癌症是否已擴散至淋巴結，癌症是否已擴散至本體中之一或多種不同部分等。在一些實施例中，可使用所謂的TNM系統對癌症進行分級，根據該系統T係指主要腫瘤之尺寸及程度，通常稱為原發腫瘤；N係指附近具有癌症之淋巴結的數目；且M係指癌症是否已轉

移。在一些實施例中，癌症可稱為0期（存在異常細胞但未擴散至附近組織，亦稱為原位癌或CIS；CIS不是癌症，但可能會變成癌症），I-III期（存在癌症；數目愈高，腫瘤愈大，且其擴散至附近組織之程度越大），或IV期（癌症已擴散至本體之遠端部分）。在一些實施例中，癌症可指定為選自由以下所組成之群組之階段：原位；局部（癌症受限於其開始之地點，不具有其擴散的跡象）；區域（癌症已擴散至附近淋巴結、組織、或器官）；遠端（癌症已擴散至本體之遠端部分）；及未知（不存在足夠資訊以判定該階段）。

**【0131】** 「刺激(stimulation)」係指藉由刺激分子與其同源配體之結合誘導的初級反應，其中該結合介導信號轉導事件。「刺激分子(stimulatory molecule)」係T細胞上之分子，例如T細胞受體(TCR)/CD3複合物，其與存在於抗原呈現細胞上之同源刺激配體特異性結合。「刺激配體(stimulatory ligand)」係當存在於抗原呈現細胞（例如APC、樹突細胞、B細胞、及類似者）上時可與T細胞上之刺激分子特異性結合的配體，從而介導T細胞之初級反應，包括但不限於活化、起始免疫反應、增生、及類似者。刺激配體包括但不限於抗CD3抗體（諸如OKT3）、載有肽之MHC I類分子、超促效劑抗CD2抗體、及超促效劑抗CD28抗體。

**【0132】** 詞組「治療劑(therapeutic agent)」可指任何藥劑，其在投予生物體時引發所欲藥理效應。在一些實施例中，若其證實跨適當群體之統計顯著效應，則將藥劑視為治療劑。在一些實施例中，適當群體可係模型生物體或人類對象之群體。在一些實施例中，適當群體可藉由各種標準定義，諸如特定年齡組、性別、遺傳背景、預先存在之臨床病況、根據生物標記之存在或不存在等。在一些實施例中，治療劑係可用於減輕、改善、和緩、抑制、預防疾病、

病症、及/或病況之一或多種症狀或特徵、延緩其發作、降低其嚴重性、及/或降低其發生率的物質。在一些實施例中，治療劑係在其銷售之前已經過或需要政府機關批准之藥劑，以便投予至人類。在一些實施例中，治療劑係需要醫學處方才能投予至人類之藥劑。

**【0133】** 治療劑（例如經工程改造之CAR T細胞）之「治療有效量(therapeutically effective amount)」、「有效劑量(effective dose)」、「有效量(effective amount)」、或「治療有效劑量(therapeutically effective dosage)」係任何量，當單獨或與另一治療劑組合使用時，保護對象免受疾病之發作或促進疾病回歸，表現為疾病症狀之嚴重程度降低、疾病無症狀期之頻率及持續時間增加，或預防由於疾病折磨造成的損害或殘疾。促進疾病回歸之治療劑之能力可使用所屬技術領域中具有通常知識者已知之各種方法評估，諸如在臨床試驗期間在人類對象中、在預測人類功效的動物模型系統中、或藉由在體外檢定中檢定藥劑之活性。

**【0134】** 用語「轉導(transduction)」及「轉導(transduced)」係指藉由病毒載體將外來DNA引入細胞中之程序（參見Jones et al., “Genetics: principles and analysis,” Boston: Jones & Bartlett Publ.(1998)）。在一些實施例中，載體係反轉錄病毒載體、DNA載體、RNA載體、腺病毒載體、桿狀病毒載體、艾司坦-巴爾(Epstein Barr)病毒載體、乳多泡病毒載體、牛痘病毒載體、單純疱疹病毒載體、腺病毒相關載體、慢病毒載體、或其任何組合。

**【0135】** 「轉化(transformation)」係指將外源DNA引入宿主細胞中之任何方法。可使用各種方法在天然或人工條件下進行轉化。轉化可使用任何已知方法來達成，該方法用於插入外來核酸序列至原核或真核宿主細胞中。在一些

實施例中，基於被轉化之宿主細胞及/或待插入之核酸來選擇一些轉化方法。轉化方法可包含但不限於病毒感染、電穿孔、及脂質轉染。在一些實施例中，「轉化」細胞係經穩定地轉化，其中所插入之DNA能夠複製作為自主複製質體或作為宿主染色體之部分。在一些實施例中，轉化之細胞可表現引入核酸。

**【0136】** 對象之「治療(treatment)」或「治療(treating)」係指向對象進行之任何類型之干預或過程，或向對象投予活性劑，目的係反轉、緩解、改善、抑制、減緩或預防症狀、併發症或病況之發作、進展、發展、嚴重程度或再發、或與疾病相關聯之生物化學指示。在一個實施例中，「治療(treatment)」或「治療(treating)」包括部分緩解。在另一實施例中，「治療」包括完全緩解。在一些實施例中，治療可係未展現出相關疾病、病症及/或病況之徵象之對象，及/或僅展現出疾病、病症及/或病況之早期徵象之對象。在一些實施例中，此類治療可係展現出相關疾病、病症及/或病況之一或多種建立徵象之對象。在一些實施例中，治療可係已診斷患有相關疾病、病症及/或病況之對象。在一些實施例中，治療可係已知具有一或多個敏感性因子之對象，該一或多個敏感性因子與相關疾病、病症及/或病況之發展風險增加的統計學上相關。

**【0137】** 用語「載體(vector)」係指經修飾以包含或合併所提供核酸序列之接受者核酸分子。一種類型之載體係「質體(plasmid)」，其係指額外DNA可連接之環狀雙股DNA分子。另一種類型之載體係病毒載體，其中額外DNA區段可連接至病毒基因體中。某些載體能夠在其等被引入的宿主細胞中自主複製（例如具有細菌複製起源之細菌載體及游離基因(episomal)哺乳動物載體）。其他載體（例如非游離基因哺乳動物載體）在引入宿主細胞中後可整合至宿主細胞之基因體中，且藉此與宿主基因體一起複製。此外，某些載體包含直接表現

可操作性地連接至其之插入基因之序列。此類載體在本文中可稱為「表現載體 (expression vector)」。標準技術可用於經工程改造之載體，例如在Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))，其以引用方式併入本文中。

【0138】 對於本揭露之目的，「基因(gene)」包括編碼基因產物之DNA區（參見下文），以及調節基因產物之產生的所有DNA區，無論此類調節序列是否相鄰於編碼及/或轉錄序列。因此，基因包括但不必然限於啟動子序列、終止子、轉譯調節序列（諸如核糖體結合位點及內部核糖體進入位點）、強化子、沉默子、絕緣子、邊界元件、複製起源、基質附著位點、及基因座控制區。

【0139】 除非具體相反地指示，否則本揭露可使用在本領域之技術範圍內之化學、生物化學、有機化學、分子生物學、微生物學、重組DNA技術、基因學、免疫學、及細胞生物學之方法，其中許多為了說明之目的描述於下文。此類技術在文獻中完整解釋。參見例如Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001)；Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982)；Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008)；*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience；Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985)；Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992)；*Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984)；Perbal, *A Practical Guide to*

*Molecular Cloning* (1984) ; Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991) ; *Annual Review of Immunology* ; 以及在期刊上之專論，諸如 *Advances in Immunology* 。

【0140】 本文揭示一種靶向一或多種細胞表面抗原之下一代CAR T細胞療法，其用於治療B細胞惡性腫瘤，諸如復發性或難治性(r/r) B細胞惡性腫瘤。同種異體嵌合抗原受體(CAR) T細胞可工程改造自衍生自健康人類捐贈者之T細胞。自體嵌合抗原受體(CAR) T細胞可以自適當的人類癌症患者經工程改造。此等經工程改造之T細胞經歷經工程改造之反轉錄病毒載體的插入，該反轉錄病毒載體編碼CAR構築體之基因，在某些態樣係抗CD19 CAR。下一代CAR構築體利用五個信號傳導域（包括CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、新穎、經修飾之CD3 $\epsilon$ 、或DAP-12）中之一者作為CD3 $\zeta$ 之替代物，該CD3 $\zeta$ 係在CAR中之標準。

【0141】 CD19（亦稱為分化19之群落(Cluster of Differentiation 19)、B淋巴球抗原CD19、B淋巴球表面抗原B4、B4、CVID3、分化抗原CD19）係由人類中CD19基因編碼之蛋白質。除非另有指明，否則應理解本揭露中對CD19之指稱係關於人類CD19。其在B細胞表面上被發現。由於CD19表現係B細胞之標誌，其可用作抗原，例如，在識別B細胞及來自B細胞之癌細胞（例如，B細胞淋巴瘤）中。抗CD19抗體可與表現於以下細胞上的CD19結合，例如，周邊血液及脾臟中之B淋巴球、B細胞慢性淋巴球性白血病(B-CLL)細胞、前淋巴球性白血病(PLL)細胞、毛細胞白血病(HCL)細胞、常見急性淋巴性白血病(CALL)細胞、前體B急性淋巴性白血病(pre-B-ALL)細胞、及NULL-急性淋巴性白血病

(NULL-ALL)細胞，以提供幾種非限制性實例。包含抗原結合系統（其包含抗CD19結合域）之例示性醫藥產品係醫藥產品YESCARTA®。YESCARTA®係CD19導向基因修飾之自體T細胞免疫療法（參見YESCARTA® FDA批准之封裝插入劑，其在與免疫治療相關之方法及組成物方面全文以引用之方式併入本文中）。包含抗原結合系統（其包含抗CD19結合域）之另一例示性醫藥產品係醫藥產品KYMRIAH®。

**【0142】** YESCARTA®及KYMRIAH®皆包含衍生自抗人類CD19抗體之抗體結合域。許多抗CD19抗體被認為結合在CD19基因之外顯子4中編碼之CD19之表位。其他抗CD19結合域可識別CD19之不同表位，或具有不同親和力之相同表位。

**【0143】** 本揭露之抗CD19結合域可包含如本文所述之抗體中所發現之抗原結合序列。在一些實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之抗原結合片段。

**【0144】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之至少一個HCDR，例如表4或表5中所揭示之至少一個HCDR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之兩個HCDR，例如表4或表5中所揭示之至少兩個HCDR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之三個HCDR，例如表4或表5中所揭示之三個HCDR。

**【0145】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之至少一個LCDR，例如表4或表5中所揭示之至少一個LCDR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之兩個LCDR，例如表4或表5中所揭示之

至少兩個LCDR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之三  
個LCDR，例如表4或表5中所揭示之三  
個LCDR。

**【0146】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之至少一個HCDR，例如表4或表5中所揭示之至少一個HCDR；及本文所提供之至少一個LCDR，例如表4或表5中所揭示之至少一個LCDR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之兩個HCDR，例如表4或表5中所揭示之至少兩個HCDR；及本文所提供之兩個LCDR，例如表4或表5中所揭示之至少兩個LCDR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所提供之三  
個HCDR，例如表4或表5中所揭示之三  
個HCDR；及本文所提供之三  
個LCDR，例如表4或表5中所揭示之三  
個LCDR。

**【0147】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之重鏈可變域之至少一個重鏈構架區（重鏈FR），例如在表4或表5所揭示之重鏈可變域之至少一個重鏈FR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之重鏈可變域之兩個重鏈FR，例如在表4或表5所揭示之重鏈可變域之至少兩個重鏈FR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之重鏈可變域之三  
個重鏈FR，例如在表4或表5所揭示之重鏈可變域之三  
個重鏈FR。

**【0148】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之輕鏈可變域之至少一個輕鏈FR，例如在表4或表5所揭示之輕鏈可變域之至少一個輕鏈FR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之輕鏈可變域之兩個輕鏈FR，例如在表4或表5所揭示之輕鏈可變域之至少兩個輕鏈

FR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之輕鏈可變域之三個輕鏈FR，例如在表4或表5所揭示之輕鏈可變域之三個輕鏈FR。

**【0149】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之重鏈可變域之至少一個重鏈FR，例如在表4或表5所揭示之重鏈可變域之至少一個重鏈FR，及本文所揭示之輕鏈可變域之至少一個輕鏈FR，例如在表4或表5所揭示之輕鏈可變域之至少一個輕鏈FR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之重鏈可變域之兩個重鏈FR，例如在表4或表5所揭示之重鏈可變域之至少兩個重鏈FR，及本文所揭示之輕鏈可變域之兩個輕鏈FR，例如在表4或表5所揭示之輕鏈可變域之至少兩個輕鏈FR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含本文所揭示之重鏈可變域之三個重鏈FR，例如在表4或表5所揭示之重鏈可變域之三個重鏈FR，及本文所揭示之輕鏈可變域之三個輕鏈FR，例如在表4或表5所揭示之輕鏈可變域之三個輕鏈FR。

**【0150】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含一、二、或三個FR，其一起或各自個別地與下列具有至少75%同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：表4或表5中所揭示之重鏈可變域之重鏈可變域之（多個）對應FR。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含一、二、或三個FR，其一起或各自個別地與下列具有至少75%同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：表4或表5中所揭示之輕鏈可變域之輕鏈可變域之（多個）對應FR。

**【0151】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含至少一個重鏈可變域，其與表4或表5所揭示之重鏈可變域具有至少75%之序列同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含兩個重鏈可變域，其各自與表4或表5所揭示之重鏈可變域具有至少75%之序列同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），其中重鏈可變域可相同或不同。

**【0152】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含至少一個輕鏈可變域，其與表4或表5所揭示之輕鏈可變域具有至少75%之序列同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）。在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含兩個輕鏈可變域，其各自與表4或表5所揭示之輕鏈可變域具有至少75%之序列同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），其中輕鏈可變域可相同或不同。

**【0153】** 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含至少一個重鏈可變域，其與表4或表5所揭示之重鏈可變域具有至少75%之序列同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）；及至少一個輕鏈可變域，其與表4或表5所揭示之輕鏈可變域具有至少75%序列同一性（例如至

少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）。

【0154】 在各種實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含兩個重鏈可變域，其各自與表4或表5所揭示之重鏈可變域具有至少75%之序列同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）；及兩個輕鏈可變域，其各自與表4或表5所揭示之輕鏈可變域具有至少75%序列同一性（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），其中在各種實施例中，(i)重鏈可變域之各者可相同或不同；或(ii)輕鏈可變域之各者可相同或不同。

表4：例示性抗CD19抗體序列(Ab1)

SEQ ID NO:	描述	序列
1	重鏈可變域	EVKLQESGPGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVIWGSETTYYNNSALKSRLTIKDNSKSKVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVT VSS
2	CDRH1 IMGT (Prot)	GVSLPDYG
3	CDRH1 Kabat (Prot)	DYGVVS
4	CDRH1 Chothia (Prot)	GVSLPDY
5	CDRH2 IMGT (Prot)	IWGSETT
6	CDRH2 Kabat (Prot)	VIWGSETTYYNNSALKS
7	CDRH2 Chothia (Prot)	WGSET
8	CDRH3 IMGT (Prot)	AKHYYYGGSYAMDY
9	CDRH3 Kabat (Prot)	HYYYGGSYAMDY
10	CDRH3 Chothia (Prot)	HYYYGGSYAMDY

11	輕鏈可變域	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y H T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T F G G G T K L E I T
12	CDRL1 IMGT (Prot)	RASQDISKYL N
13	CDRL1 Kabat (Prot)	RASQDISKYL N
14	CDRL1 Chothia (Prot)	RASQDISKYL N
15	CDRL2 IMGT (Prot)	HTSRLHS
16	CDRL2 Kabat (Prot)	HTSRLHS
17	CDRL2 Chothia (Prot)	HTSRLHS
18	CDRL3 IMGT (Prot)	QQGNTLPYT
19	CDRL3 Kabat (Prot)	QQGNTLPYT
20	CDRL3 Chothia (Prot)	QQGNTLPYT
21	scFv (Prot)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y H T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T F G G G T K L E I T G S T S G S G K P G S G E G S T K G E V K L Q E S G P G L V A P S Q S L S V T C T V S G V S L P D Y G V S W I R Q P P R K G L E W L G V I W G S E T T Y Y N S A L K S R L T I I K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D Y W G Q G T S V T V S S
22	連接子 (Prot)	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

表5：例示性抗CD19抗體序列(Ab2)

SEQ ID NO:	描述	序列
23	重鏈可變域	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKDSGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTTNYAQQFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSED TAVYYCAREAVAADWLDPWGQGLVTV SS
24	CDRH1 IMGT (Prot)	GGTFSSYA
25	CDRH1 Kabat (Prot)	SYAIS
26	CDRH1 Chothia (Prot)	GGTFSSY
27	CDRH2 IMGT (Prot)	IPIFGTT
28	CDRH2 Kabat (Prot)	GIPIFGTTNYAQQFQG
29	CDRH2 Chothia (Prot)	PIFG
30	CDRH3 IMGT (Prot)	AREAVAADWLDP
31	CDRH3 Kabat (Prot)	EAVAADWLDP
32	CDRH3 Chothia (Prot)	AVAADWLD

33	輕鏈可變域	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYGSSRFTFGPGTKVDIK
34	CDRL1 IMGT (Prot)	QSVSSSY
35	CDRL1 Kabat (Prot)	RASQSVSSSYLA
36	CDRL1 Chothia (Prot)	SQSVSSSY
37	CDRL2 IMGT (Prot)	GAS
38	CDRL2 Kabat (Prot)	GASSRAT
39	CDRL2 Chothia (Prot)	GAS
40	CDRL3 IMGT (Prot)	QQYGSSRFT
41	CDRL3 Kabat (Prot)	QQYGSSRFT
42	CDRL3 Chothia (Prot)	YGSSRF
43	scFv (Prot)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYGSSRFTFGPGTKVDIKGSTSGSGKPGSGEGS TKGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKDSGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQQFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDYAVYYCAREAVAADWLDPWGQGT LTVSS
22	連接子 (Prot)	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

**【0155】** 嵌合抗原受體(CAR)係經工程改造之受體，其可引導或重導T細胞（例如捐贈者T細胞）以靶向所選抗原。CAR可經工程改造以識別抗原且當與抗原（諸如CD19）結合時，活化免疫細胞以攻擊及破壞攜帶抗原之細胞。當這些抗原存在於腫瘤細胞上時，表現該CAR之免疫細胞即可靶向及殺滅該腫瘤細胞。CAR通常包含介導抗原結合之胞外結合域（例如抗CD19結合域）、當CAR存在於細胞表面或細胞膜時跨越或理解為跨越細胞膜之跨膜域、及胞內（或細胞質）信號傳導域。

**【0156】** 一或多種抗原結合域判定抗原結合系統之目標。結合域可包含任何感興趣之抗原的結合域，例如藉由本揭露所提供之抗體，例如本揭露之結

合模體。結合域使用於嵌合抗原受體中，至少部分係因為其可經工程改造以與其他CAR組分表現為單鏈之部分。參見，例如美國專利第7,741,465號、及第6,319,494號、以及Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136, Krause et al., *J. Exp. Med.*, Volume 188, No. 4, 1998 (619-626) ; Finney et al., *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2791-2797，其中之各者關於CAR中之結合域以引用方式併入本文中。結合域或scFv係單鏈抗原結合片段，其包含重鏈可變域及輕鏈可變域，該重鏈可變域及輕鏈可變域鏈接或連接在一起。參見，例如美國專利第7,741,465號、及第6,319,494號、以及Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136，其中之各者關於結合域以引用方式併入本文中。當衍生自親本抗體時，結合域可保留一些、保留全部、或基本上保留親本抗體與目標抗原之結合。在一些實施例中，本文所涵蓋之CAR包含抗原特異性結合域，其可係結合在癌細胞上表現之抗原之scFv（鼠類、人類或人源化scFv）。在某些實施例中，scFv結合CD19。

**【0157】** 在某些實施例中，本文所涵蓋之CAR可包含各種域之間的連接子殘基，例如在VH及VL域之間，添加用於分子之適當間隔構形。本文所涵蓋之CAR可包含一、兩個、三個、四個、或五個或更多個連接子。在一些實施例中，連接子之長度係約1至約25個胺基酸、約5至約20個胺基酸、或約10至約20個胺基酸、或任何中介長度之胺基酸。在一些實施例中，連接子係1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多個胺基酸長。

**【0158】** 連接子之說明性實例包括甘胺酸聚合物(G)<sub>n</sub>；甘胺酸-絲胺酸聚合物(G<sub>1-5</sub>S<sub>1-5</sub>)<sub>n</sub>，其中n為至少一、二、三、四、或五之整數；甘胺酸-丙胺酸聚

合物；丙胺酸-絲胺酸聚合物；及所屬技術領域中已知之其他可撓性連接子。甘胺酸及甘胺酸-絲胺酸聚合物係相對非結構化，且因此可能夠作為融合蛋白（諸如本文所述之CAR）之域之間的中性繫鏈。甘胺酸甚至比丙胺酸能進入更多的 $\phi$ - $\psi$ 空間，且比具有較長側鏈之殘基限制更少（參見Scheraga, *Rev.*

*Computational Chem.* 11173-142 (1992)）。本文所涵蓋之其他連接子包括惠特洛(Whitlow)連接子（參見Whitlow, *Protein Eng.* 6(8): 989-95 (1993)）。所屬技術領域中具有通常知識者將認識到，一些實施例中之CAR的設計可包括全部或部分可撓性之連接子，使得連接子可包括可撓性連接子以及賦予較低可撓性結構之一或多個部分，以提供所欲CAR結構。在一個實施例中，本文所述之建構體中之任一者可包含「GS」連接子。在另一實施例中，本文所述之建構體中之任一者包含「GSG」連接子。在一實施例中，甘胺酸-絲胺酸連接子包含胺基酸序列GS (SEQ ID NO: 45)或由其所組成。在一實施例中，甘胺酸-絲胺酸連接子包含胺基酸序列GGGSGGGS (SEQ ID NO: 46)或由其所組成。在另一實施例中，本文所述之CAR包含與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）：SEQ ID NO: 22。

**【0159】** 在某些實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含結合域，其包含本揭露之重鏈可變域、本揭露之輕鏈可變域、及與SEQ ID NO: 22具有至少75%序列同一性之連接子（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、

或95至100%)。在某些實施例中，本揭露之抗CD19結合域包含結合域，其包含根據SEQ ID NO: 22之連接子。

**【0160】** 本文所述之經工程改造之CAR亦可包含在scFv或抗原結合域之N端處之N端信號肽或標籤。在一個實施例中，可使用異源信號肽。可將抗原結合域或scFV融合至前導或信號肽，其將初生蛋白質引導至內質網且隨後轉位至細胞表面。應理解的是，一旦含有信號肽之多肽在細胞表面表現，信號肽通常在多肽於內質網中處理並轉位至細胞表面之期間被蛋白裂解移除。因此，諸如本文所描述之CAR建構體之多肽作為缺乏信號肽之成熟蛋白通常在細胞表面處表現，而多肽之前驅物形式包括信號肽。可使用所屬技術領域中已知之任何合適的信號序列。類似地，亦可使用所屬技術領域中已知之任何已知標籤序列。在某些實施例中，本揭露之結合域包含抗CD19結合域，其包含本揭露之重鏈可變域、本揭露之輕鏈可變域、及與SEQ ID NO: 44具有至少75%序列同一性之信號序列（例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 44)。

**【0161】** 在實施例中，CAR包含進一步包含可變區連接序列之scFv。

「可變區連接序列(variable region linking sequence)」係將重鏈可變區與輕鏈可變區連接之胺基酸序列，且提供與兩個子結合域之交互作用相容的間隔子功能，使得所得多肽保留與包含相同之輕及重鏈可變區之抗體對相同目標分子之特異性結合親和力。在一個實施例中，可變區連接序列係1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多個胺基酸長。

【0162】 在實施例中，CAR之結合域接著係一或多個「間隔域(spacer domain)」，其係指移動抗原結合域遠離效應細胞表面以使適當的細胞/細胞接觸、抗原結合及活化之區(Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419)。間隔域可衍生自天然、合成、半合成、或重組源。在某些實施例中，間隔域係免疫球蛋白之部分，包括但不限於一或多個重鏈恆定區，例如CH2及CH3。間隔域可包括天然存在之免疫球蛋白鉸鏈區或改變免疫球蛋白鉸鏈區之胺基酸序列。

【0163】 CAR之結合域可通常接著一或多個「鉸鏈域(hinge domain)」，其在定位抗原結合域遠離效應細胞表面上起作用，以實現適當的細胞/細胞接觸、抗原結合及活化。CAR通常包含結合域與跨膜域之間的一或多個鉸鏈域。鉸鏈域可衍生自天然、合成、半合成、或重組源。鉸鏈域可包括天然存在之免疫球蛋白鉸鏈區或改變免疫球蛋白鉸鏈區之胺基酸序列。

【0164】 在一些實施例中，本揭露之抗原結合系統可包含係來自、或衍生自（例如包含所有或片段）類免疫球蛋白鉸鏈域之鉸鏈。在一些實施例中，鉸鏈域來自免疫球蛋白或衍生自免疫球蛋白。在一些實施例中，鉸鏈域係選自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、或IgM、或其片段之鉸鏈。

【0165】 鉸鏈可衍生自天然來源或合成來源。適用於本文所述之CAR之鉸鏈域包括衍生自類型1膜蛋白質（諸如CD8 $\alpha$ 、CD4、CD28及CD7）之胞外區的鉸鏈區，其可係來自此等分子之野生型鉸鏈區，或可改變，例如截短CD28鉸鏈域。鉸鏈可衍生自天然來源或合成來源。在一些實施例中，本揭露之抗原結合系統可包含係來自、或衍生自（例如包含所有或片段）CD2、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD4、CD7、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、CD11a (ITGAL)、CD11b (ITGAM)、CD11c (ITGAX)、CD11d (ITGAD)、CD18 (ITGB2)、CD19 (B4)、

CD27 (TNFRSF7)、CD28、CD28T、CD29 (ITGB1)、CD30 (TNFRSF8)、CD40 (TNFRSF5)、CD48 (SLAMF2)、CD49a (ITGA1)、CD49d (ITGA4)、CD49f (ITGA6)、CD66a (CEACAM1)、CD66b (CEACAM8)、CD66c (CEACAM6)、CD66d (CEACAM3)、CD66e (CEACAM5)、CD69 (CLEC2)、CD79A (B細胞抗原受體複合物相關 $\alpha$ 鏈)、CD79B (B細胞抗原受體複合物相關 $\beta$ 鏈)、CD84 (SLAMF5)、CD96 (Tactile)、CD100 (SEMA4D)、CD103 (ITGAE)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD158A (KIR2DL1)、CD158B1 (KIR2DL2)、CD158B2 (KIR2DL3)、CD158C (KIR3DP1)、CD158D (KIRDL4)、CD158F1 (KIR2DL5A)、CD158F2 (KIR2DL5B)、CD158K (KIR3DL2)、CD160 (BY55)、CD162 (SELPLG)、CD226 (DNAM1)、CD229 (SLAMF3)、CD244 (SLAMF4)、CD247 (CD3- $\zeta$ )、CD258 (LIGHT)、CD268 (BAFFR)、CD270 (TNFSF14)、CD272 (BTLA)、CD276 (B7-H3)、CD279 (PD-1)、CD314 (NKG2D)、CD319 (SLAMF7)、CD335 (NK-p46)、CD336 (NK-p44)、CD337 (NK-p30)、CD352 (SLAMF6)、CD353 (SLAMF8)、CD355 (CRTAM)、CD357 (TNFRSF18)、可誘導型T細胞共刺激劑(ICOS)、LFA-1 (CD11a/CD18)、NKG2C、DAP-10、ICAM-1、NKp80 (KLRF1)、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、LFA1-1、SLAMF9、LAT、GADS (GrpL)、SLP-76 (LCP2)、PAG1/CBP、 $\alpha$ CD83配位體、Fc $\gamma$ 受體、MHC 1類分子、MHC 2類分子、TNF受體蛋白、免疫球蛋白蛋白質、細胞介素受體、整合素、活化NK細胞受體、或Toll配位體受體、或其片段或組合。在實施例中，鉸鏈域包含CD28鉸鏈區。在實施例中，本文所述之CAR包含來自CD28之鉸鏈域，該CD8 $\alpha$ 具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或

100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：SEQ ID NO: 47

(IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO: 47))。

在實施例中，鉸鏈域包含CD28T鉸鏈區。在實施例中，本文所述之CAR包含來自CD28之鉸鏈域，該CD8 $\alpha$ 具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：SEQ ID NO: 48 (LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO: 48))。在實施例中，鉸鏈域包含CD8a鉸鏈區。在實施例中，本文所述之CAR包含來自CD8a之鉸鏈域，該CD8 $\alpha$ 具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）：SEQ ID NO: 49或77

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 49))

TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 77))。

**【0166】** 此等鉸鏈域之多核苷酸及多肽序列係已知的。在一些實施例中，編碼鉸鏈域之多核苷酸包含與已知核苷酸序列至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至

100%) 同一之核苷酸序列。在一些實施例中，鉸鏈域之多肽序列包含與已知多肽序列至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100% (例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%) 同一之多肽序列。

**【0167】** 一般而言，(例如抗原結合系統之)「跨膜域(transmembrane domain)」係指當在細胞表面或細胞膜存在於分子中時，具有存在於膜中之屬性的域(例如跨越一部分或所有細胞膜)。本揭露之抗原結合系統之共刺激域可進一步包含跨膜域及/或胞內信號傳導域。不需要跨膜域中之每一胺基酸存在於膜中。舉例而言，在一些實施例中，跨膜域特徵在於蛋白質之指定段或部分實質上位於膜中。可使用多種演算法分析胺基酸或核酸序列以預測蛋白質子細胞定位(例如跨膜定位)。程式psort (PSORT.org)及Prosit (prosite.expasy.org)係此類程式之例示性。

**【0168】** 包含於本文所述之抗原結合系統中之跨膜域的類型不限於任何類型。在一些實施例中，選擇與結合域及/或胞內域天然相關之跨膜域。在一些情況下，跨膜域包含一或多個胺基酸之修飾(例如缺失、插入、及/或取代)，例如以避免此類域與相同或不同表面膜蛋白之跨膜域結合，以最小化與受體複合物之其他成員的交互作用。跨膜域可衍生自天然或合成來源。在來源係天然之情況下，域可衍生自任何膜結合或跨膜蛋白。例示性跨膜域可衍生自(例如可包含至少一跨膜域) T細胞受體之 $\alpha$ 、 $\beta$ 、或 $\zeta$ 鏈、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、CD9、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD16、CD22、CD27、CD33、CD37、CD64、

CD80、CD86、CD134、CD137、TNFSFR25、CD154、4-1BB/CD137、活化NK細胞受體、免疫球蛋白、B7-H3、BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD19a、CD2、CD247、CD276 (B7-H3)、CD29、CD30、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD84、CD96 (Tactile)、CDS、CEACAM1、CRT AM、細胞介素受體、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fc $\gamma$ 受體、GADS、GITR、HVEM(LIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、Ig $\alpha$  (CD79a)、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、可誘導型T細胞共刺激劑(ICOS)、整合素、ITGA4、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、LFA-1、與CD83、LIGHT、LIGHT、LTBR、Ly9 (CD229)結合之配位體、淋巴球功能相關抗原1(LFA-1; CD1-1a/CD18)、MHC第1型分子、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、OX-40、PAG/Cbp、程式性死亡1 (PD-1)、PSGL1、SELPLG (CD162)、信號傳導淋巴球性活化分子 (SLAM蛋白)、SLAM (SLAMF1; CD150 ; IPO-3)、SLAMF4 (CD244; 2B4)、SLAMF6 (NTB-A; Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNF受體蛋白、TNFR2、TNFSF14、鐳配體受體、TRANCE/RANKL、VLA1、或VLA-6、或其片段、截短、或組合。在一些實施例中，跨膜域可為合成 (且可例如包含主要疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸)。在一些實施例中，苯丙胺酸之三聯體、色胺酸、及纈胺酸包含在合成跨膜域之各端處。在一些實施例中，跨膜域直接鏈接或連接至細胞質域。在一些實施例中，短寡肽或多肽連接子 (例如在長度之2與10個胺基酸之間) 可形成跨膜域與胞內域之間的連接。在一些實施例中，連接子係甘胺酸-絲胺酸雙聯體。在實施例中，本文所述之CAR包含來自CD28之TM

域，其具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：SEQ ID NO: 50

(FWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 50))。在實施例中，本文所述之CAR包含來自CD8a之TM域，其具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：SEQ ID NO: 51或SEQ ID NO: 78

(IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO: 51))。

(IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 78))。

**【0169】** 本文所提供之跨膜域之多核苷酸及多肽序列係已知的。在一些實施例中，編碼跨膜域之多核苷酸包含與已知核苷酸序列至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）同一之核苷酸序列。在一些實施例中，跨膜域之多肽序列包含與已知多肽序列至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%、或約100%（例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%）同一之多肽序列。可選地，短間隔子可在CAR之任何或一些胞外、跨膜、及胞內域之間形成連接。

【0170】 已知可在抗原結合至免疫細胞時轉導信號的胞內信號傳導域，其中任一者可包含於本揭露之抗原結合系統中。舉例而言，已知T細胞受體(TCR)之細胞質序列在TCR結合至抗原之後起始信號轉導（參見例如Brownlie et al., Nature Rev. Immunol. 13:257-269 (2013)）。

【0171】 在實施例中，本文所涵蓋之CAR包含胞內信號傳導域。「胞內信號傳導域」係指CAR之部分，其參與將有效CAR結合至目標抗原之訊息轉導至免疫效應細胞內部以引發效應細胞功能，例如活化、細胞介素產生、增生、及細胞毒性活性，包括細胞毒性因子至結合CAR之目標細胞的釋放、或與胞外CAR域結合之抗原引發的其他細胞反應。在一些實施例中，信號傳導域及/或活化域包含衍生自CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、或DAP-12、或其片段、截短、或其組合之細胞質信號傳導域。

【0172】 用語「效應功能(effector function)」係指細胞之特定功能。T細胞之效應功能，例如可係細胞溶解活性或包括細胞介素之分泌之幫助或活性。因此，用語「胞內信號傳導域」係指蛋白質之部分，其轉導效應功能信號且引導細胞以執行特定功能。雖然通常可採用整個胞內信號傳導域，但在許多情況下，不必使用整個域。在使用胞內信號傳導域之截短部分的程度，只要其轉導效應功能信號，則可使用此類截短部分代替整個域。用語胞內信號傳導域意欲包括足以轉導效應功能信號之胞內信號傳導域之任何截短部分。

【0173】 在一個實施例中，CAR具有CD3 $\epsilon$ 域，該CD3 $\zeta$ 域具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPPVPNPDIYPIRKGQRDLYSGLNQRRI (SEQ ID NO: 52)。在實施例中，CD3 $\epsilon$ 域係由核酸編碼，該核酸與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

AAGAACCGGAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACAAGAGGTGCTGGTGCTG  
GCGGCAGACAGAGAGGCCAGAACAAGAAAGACCTCCTCCTGTGCCTAA  
TCCTGACTACGAGCCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACAGCGGC  
CTGAACCAGCGGCGGATT (SEQ ID NO: 53)。

【0174】 在實施例中，CD3 $\epsilon$ 域係由核酸編碼，該核酸與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO: 54)。

【0175】 在一個實施例中，CAR具有新CD3 $\epsilon$ 域，稱為 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)，其具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGL (SEQ ID NO: 87)。在實施例中，稱為 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)之CD3 $\epsilon$ 域係由核酸編碼，該核酸與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTC (SEQ ID NO: 79)。

【0176】 在一個實施例中，CAR具有新CD3 $\epsilon$ 域，稱為 $\epsilon$ -CO (R183K)，其具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLN  
QKRI (SEQ ID NO: 88)。在實施例中，稱為 $\epsilon$ -CO (R183K)之CD3 $\epsilon$ 域係由核酸編碼，該核酸與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA

ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO: 80)。

**【0177】** 在一個實施例中，CAR具有新CD3 $\epsilon$ 域，稱為 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)，其具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYNGLN  
QKRI (SEQ ID NO: 89)。在實施例中，CD3 $\epsilon$ 域係由核酸編碼，該核酸與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACAACGGT  
CTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO: 81)。

**【0178】** 在某些態樣中，新穎的CD3 $\epsilon$ 域、 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)、 $\epsilon$ -CO (R183K)、及 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)改善了CAR向細胞膜之運輸。

**【0179】** 在一個實施例中，CAR具有CD3 $\delta$ 域，該CD3 $\zeta$ 域具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 55)。在實施例中，CD3 $\delta$ 域係由核酸編碼，該核酸與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GGACACGAAACAGGCAGACTTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCT  
GAGAAACGACCAGGTGTACCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCAG  
TACTCTCACCTCGGCGGCAATTGGGCCAGAAACAAG (SEQ ID NO: 56)。

**【0180】** 在一個實施例中，CAR具有CD3 $\gamma$ 域，該CD3 $\zeta$ 域具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

GQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 57)。

在實施例中，CD3 $\gamma$ 域係由核酸編碼，該核酸與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GGACAGGATGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCCTGC  
TGCCTAACGACCAGCTGTACCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCA  
GTACAGCCATCTGCAGGGCAACCAGCTGCGGAGAAAC (SEQ ID NO: 58)。

**【0181】** 在一個實施例中，CAR具有DAP-12域，該CD3 $\zeta$ 域具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK  
(SEQ ID NO: 59)。在實施例中，DAP-12域係由核酸編碼，該核酸與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

TACTTCCTGGGCAGACTGGTGCCTAGAGGAAGAGGAGCTGCTGAGGCTGC  
TACCAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACCGAGAGCCCTTACCAGGAGCTG  
CAGGGACAGAGAAGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGAGACCTT  
ACTACAAG (SEQ ID NO: 60)。

**【0182】** 已知透過單獨TCR產生之信號不足於完全活化T細胞且亦可能需要二級或共刺激信號。因此，T細胞活化可說是藉由兩種不同類別的胞內信號傳導域介導：透過TCR（例如TCR/CD3複合物）起始抗原依賴性初級活化之初級信號傳導域及以抗原非依賴性方式作用之共刺激信號傳導域，以提供二級或共刺激信號。在一些實施例中，本文所設想之CAR包含含一或多個「共刺激信號傳導域」及「初級信號傳導域」之胞內信號傳導域。

**【0183】** 本文所涵蓋之CAR包含一或多個共刺激信號傳導域以增強T細胞表現CAR受體之功效及擴增。如本文所用，用語「共刺激信號傳導域」或「共刺激域」係指共刺激分子之胞內信號傳導域。在一些實施例中，共刺激分

子可包括CD27、CD28、CD137(4-1BB)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS (CD278)、CTLA4、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、TRIM、LCK3、SLAM、DAPIO、LAG3、HVEM、及NKD2C、及CD83。在實施例中，本文所述之CAR包含CD28共刺激域，其具有與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：SEQ ID NO: 61。

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 61)。

**【0184】** 在實施例中，本文所述之CAR包含4-1BB共刺激域，其具有與下列具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%）：SEQ ID NO: 93。

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE (SEQ ID NO: 93)。

**【0185】** CAR之組分可使用生物技術用於等效組分之常規技術交換或「對換(swapped)」。為僅提供幾個非限制性及部分實例，本揭露之CAR可包含如本文所提供之結合域與本文所提供之鉸鏈及本文所提供之共刺激域之組合。在某些實例中，本揭露之CAR可包含如本文所提供之前導序列連同如本文所提供之結合域與本文所提供之鉸鏈及本文所提供之s共刺激域之組合。

**【0186】** 在某些態樣中，本揭露包含編碼本文所提供之抗CD19結合域之核酸。在某些進一步的態樣中，本揭露包含編碼本文所提供之抗體之核酸，其包含但不限於編碼抗CD19結合域之核酸。在某些進一步的態樣中，本揭露包含

編碼本文所提供之抗原結合系統之核酸，其包含但不限於編碼抗CD19嵌合抗原受體之核酸。

**【0187】** 在實施例中，抗CD19 CAR構築體具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  
LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT  
GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV  
WIRQPPRKGLEWLGVWVGGVTLVAFIIFWVRSKRSRLLS  
DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHV  
GKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLS  
DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKNRKAKAKPVTRGAGAGGR  
QRGQNKERPPPVPNPDIYEPYRIRKQKRDLYSGLNQRRRI (SEQ ID NO: 62)。

在實施例中，抗CD19 CAR藉由核酸編碼，該核酸與以下序列之核酸具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GATATACAGATGACCCAAACGACGTCTAGCCTCAGTGCGTCACTCGGGGA  
TCGGGTGACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTTCAAAATATCTTA  
ACTGGTATCAACAAAAGCCAGATGGAACCGTAAACTGCTCATATACCAC  
ACCAGTCGCCTGCATTCAGGGGTTCCGAGCCGCTTTTCTGGGAGCGGTAG  
CGGAACtGAtTATAGCTTGACAATAAGCAACCTCGAGCAGGAAGACATTG

CGACGTACTTCTGTCAGCAAGGGAACACGCTGCCGTATACCTTCGGTGGC  
GGCACTAAACTGGAAATCACGGGATCTACGTCTGGATCCGGAAAACCTG  
GATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAGTCAAGTTGCAAGAGTCTGG  
ACCTGGTCTCGTGGCACCTTCACAGTCACTCTCCGTTACCTGTACCGTATC  
TGGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGTGTCATGGATACGCCAACCACCGC  
GAAAAGGTCTTGAATGGCTGGGCGTTATCTGGGGATCCGAAACCACATAC  
TACAACCTCTGCGCTCAAGTCACGGCTGACTATTATAAAGGACAATTCAA  
GAGCCAAGTGTTCTGAAAATGAACAGCCTGCAGACTGATGACACTGCA  
ATATATTACTGCGCCAAGCATTACTATTACGGCGGATCTTACGCGATGGA  
TTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTAACAGTCAGCTCCGCGGCCGCATTGG  
ACAATGAAAAATCCAATGGCACAATAATTCATGTAAAGGGCAAACACTT  
GTGTCCTAGCCCCTCTTTCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTGGGTGCTCGT  
TGTGGTTGGAGGCGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGTTGGTGACTGTAGCCTT  
TATAATATTCTGGGTTAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTACATTCAGACT  
ATATGAACATGACACCAAGACGCCCCGGCCCCACAAGAAAACACTATCA  
GCCCTATGCTCCGCCTCGGGACTTCGCTGCTTACCGAAGCAAGAACCGCA  
AAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGAC  
AACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTAT  
GAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTCAATCAGAG  
GCGAATT (SEQ ID NO: 63)。在實施例中，抗CD19 CAR藉由核酸編碼，該核  
酸與以下序列之核酸具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至  
少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至

100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%)，該核酸具有根據下列之序列：

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGA  
CCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGA  
ATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAC  
ACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAG  
CGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCG  
CTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTCGGAGGA  
GGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTG  
GAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCG  
GACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTG  
AGCGGCGTGTCCCTTCCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCCGCCAACCTCCA  
AGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCT  
ACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCC  
AAGAGCCAAGTGTTCCCTGAAGATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGC  
TATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGG  
ACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTG  
GACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACC  
TGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCG  
TGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCT  
TTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGA  
CTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTAC  
CAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAAGAACCG

GAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACAAGAGGTGCTGGTGCTGGCGGCAGA  
 CAGAGAGGCCAGAACAAAGAAAGACCTCCTCCTGTGCCTAATCCTGACTA  
 CGAGCCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACAGCGGCCTGAACCAG  
 CGGCGGATT (SEQ ID NO: 64)。

【0188】 在實施例中，抗CD19 CAR構築體具有與下列具有至少75%序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  
 LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT  
 GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV  
 WIRQPPRKGLEWLGVWVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLLS  
 DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHV  
 GKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLLS  
 DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGHETGRLSGAADTQALLRND  
 QVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 65)。

在實施例中，抗CD19 CAR藉由核酸編碼，該核酸與以下序列之核酸具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGA  
 CCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGA  
 ATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAC

ACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAG  
CGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCG  
CTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTCGGAGGA  
GGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTG  
GAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCG  
GACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTG  
AGCGGCGTGTCCCTTCCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCCGCCAACCTCCA  
AGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCT  
ACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCC  
AAGAGCCAAGTGTTCCTGAAGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGC  
TATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGG  
ACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTG  
GACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACC  
TGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCG  
TGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCT  
TTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGA  
CTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTAC  
CAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCGGACACGA  
AACAGGCAGACTTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCTGAGAAACG  
ACCAGGTGTACCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCCAGTACTCTCAC  
CTCGGCGGCAATTGGGCCAGAAACAAG (SEQ ID NO: 66)。

**【0189】** 在一實施例中，抗CD19 CAR構築體具有與下列具有至少75%  
序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或

100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、或95至100%），該胺基酸序列根據：

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  
LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT  
GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV  
WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT  
DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHV  
GKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS  
DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGQDGVQRASDKQTLNPND  
QLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 67)。

**【0190】** 在實施例中，抗CD19 CAR藉由核酸編碼，該核酸與以下序列之核酸具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGA  
CCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGA  
ATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAC  
ACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAG  
CGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCG  
CTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTCGGAGGA  
GGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTG  
GAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCG  
GACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTG

AGCGGCGTGTCCCTTCCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCCGCCAACCTCCA  
 AGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCT  
 ACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCC  
 AAGAGCCAAGTGTTCCCTGAAGATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGC  
 TATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGG  
 ACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTG  
 GACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACC  
 TGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCG  
 TGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCT  
 TTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGA  
 CTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTAC  
 CAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCGGACAGGA  
 TGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCCTGCTGCCTAAC  
 GACCAGCTGTACCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCAGTACAGCC  
 ATCTGCAGGGCAACCAGCTGCGGAGAAAC (SEQ ID NO: 68)。

【0191】 在一實施例中，抗CD19 CAR構築體具有與下列具有至少75%  
 序列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或  
 100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、  
 或95至100%），該胺基酸序列根據：

DIQMTQTTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYHTSR  
 LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT  
 GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV  
 WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIKDNSK SQVFLKMNSLQT

DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVK  
GKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLLS  
DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSYFLGRLVPRGRGAAEAATR  
QRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO: 69)。

【0192】 在實施例中，抗CD19 CAR藉由核酸編碼，該核酸與以下序列之核酸具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGA  
CCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGA  
ATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAC  
ACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAG  
CGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCG  
CTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTCGGAGGA  
GGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTG  
GAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCG  
GACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTG  
AGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCCGCCAACCTCCA  
AGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCT  
ACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCC  
AAGAGCCAAGTGTTCTGAAGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGC  
TATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGG  
ACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTG

GACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACC  
 TGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCG  
 TGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCT  
 TTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGA  
 CTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTAC  
 CAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCTACTTCCTG  
 GGCAGACTGGTGCCTAGAGGAAGAGGAGCTGCTGAGGCTGCTACCAGAA  
 AGCAGAGAATCACCGAGACCGAGAGCCCTTACCAGGAGCTGCAGGGACA  
 GAGAAGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGAGACCTTACTACAAG  
 (SEQ ID NO: 70)。

**【0193】** 在實施例中，抗CD19 CAR構築體具有與下列具有至少75%序  
 列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或  
 100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、  
 或95至100%），該胺基酸序列根據：

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  
 LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT  
 GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS  
 WIRQPPRKGLEWLGVIVGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT  
 DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVK  
 GKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLLS  
 DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQ  
 LYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE

AYSEIGMKGERRRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 71)。

【0194】 在實施例中，抗CD19 CAR藉由核酸編碼，該核酸與以下序列之核酸具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGA  
CCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGA  
ATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAC  
ACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAG  
CGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCG  
CTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTCGGAGGA  
GGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTG  
GAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCG  
GACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTG  
AGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCCGCCAACCTCCA  
AGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCT  
ACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCC  
AAGAGCCAAGTGTTCTGAAGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGC  
TATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGG  
ACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTG  
GACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACC  
TGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCG

TGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCT  
 TTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGA  
 CTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTAC  
 CAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAGGGTGAA  
 GTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCAAC  
 TGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGA  
 CAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCAAGAAGAAA  
 GAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAGGACAAGATGGCT  
 GAGGCTTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAGGAAAG  
 GGACACGACGGACTGTACCAAGGCCTGAGCACCGCTACCAAGGACACCT  
 ACGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO: 72)。

【0195】 在實施例中，抗CD19 CAR構築體具有與下列具有至少75%序  
 列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或  
 100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、  
 或95至100%），該胺基酸序列根據：

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  
 LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT  
 GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV  
 WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT  
 DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHV  
 GKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS  
 DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ  
 LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAE

AFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 73)。

【0196】 在實施例中，抗CD19 CAR藉由核酸編碼，該核酸與以下序列之核酸具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGA  
CCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGA  
ATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAC  
ACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAG  
CGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCG  
CTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTCGGAGGA  
GGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTG  
GAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCG  
GACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTG  
AGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCTGGATCCGCCAACCTCCA  
AGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCT  
ACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCC  
AAGAGCCAAGTGTTCTGAAGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGC  
TATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGG  
ACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTG  
GACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACC  
TGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCG

TGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCT  
 TTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGA  
 CTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTAC  
 CAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCCGGGTGAA  
 GTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCAAC  
 TGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGA  
 CAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCAAGAAGAAA  
 GAACCCTCAAGAGGGCCTGTTTAAACGAGCTGCAAAGGACAAGATGGCT  
 GAGGCTTTCTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAGGAAAG  
 GGACACGACGGACTGTTCCAAGGCCTGAGCACCGCTACCAAGGACACCTT  
 CGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO: 74)。

【0197】 在實施例中，抗CD19 CAR構築體具有與下列具有至少75%序  
 列同一性之胺基酸序列（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或  
 100%同一性；例如85至90%、85至95%、85至100%、90至95%、90至100%、  
 或95至100%），該胺基酸序列根據：

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  
 LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT  
 GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS  
 WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT  
 DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVK  
 GKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS  
 DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNNQ  
 LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE

AYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 75)。

【0198】 在實施例中，抗CD19 CAR藉由核酸編碼，該核酸與以下序列之核酸具有至少75%序列同一性（諸如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、或100%同一性；例如85%至90%、85%至95%、85%至100%、90%至95%、90%至100%、或95%至100%），該核酸具有根據下列之序列：

GATATACAGATGACCCAAACGACGTCTAGCCTCAGTGCGTCACTCGGGGA  
TCGGGTGACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTTCAAATATCTTA  
ACTGGTATCAACAAAAGCCAGATGGAACCGTAAACTGCTCATATACCAC  
ACCAGTCGCCTGCATTCAGGGGTTCCGAGCCGCTTTTCTGGGAGCGGTAG  
CGGAACtGAfTATAGCTTGACAATAAGCAACCTCGAGCAGGAAGACATTG  
CGACGTACTTCTGTCAGCAAGGGAACACGCTGCCGTATACCTTCGGTGGC  
GGCACTAAACTGGAAATCACGGGATCTACGTCTGGATCCGGAAAACCTG  
GATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAGTCAAGTTGCAAGAGTCTGG  
ACCTGGTCTCGTGGCACCTTCACAGTCACTCTCCGTTACCTGTACCGTATC  
TGGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGTGTCATGGATACGCCAACCACCGC  
GAAAAGGTCTTGAATGGCTGGGCGTTATCTGGGGATCCGAAACCACATAC  
TACAACCTCTGCGCTCAAGTCACGGCTGACTATTATAAAGGACAATTCAA  
GAGCCAAGTGTTCCCTGAAAATGAACAGCCTGCAGACTGATGACACTGCA  
ATATATTACTGCGCCAAGCATTACTATTACGGCGGATCTTACGCGATGGA  
TTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTAACAGTCAGCTCCGCGGCCCGCATTGG  
ACAATGAAAAATCCAATGGCACAATAATTCATGTAAAGGGCAAACACTT  
GTGTCCTAGCCCCTCTTTCCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTGGGTGCTCGT

TGTGGTTGGAGGCGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGTTGGTGACTGTAGCCTT  
TATAATATTCTGGGTTAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTACATTCAGACT  
ATATGAACATGACACCAAGACGCCCCGGCCCCACAAGAAAACACTATCA  
GCCCTATGCTCCGCCTCGGGACTTCGCTGCTTACCGAAGCAGAGTTAAGT  
TCAGCAGGAGCGCCGACGCACCTGCCTACCAaCAAGGGCAGAATCAACTG  
TACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAGGAATACGATGTGCTGGACA  
AGAGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCTAGAAGAAAGA  
ACCCCCAGGAGGGCCTGTATAATGAGCTCCAGAAGGATAAGATGGCCGA  
GGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAAAGAAGAAGAGGCAAGGG  
CCACGACGGCCTCTACCAGGGCTTAAGCACAGCTACTAAGGACACCTACG  
ACGCCCTGCACATGCAAGCTCTGCCCCCTAGA (SEQ ID NO: 76)。

【0199】 一般而言，應理解，任何適當病毒載體可用於轉導本文所述之經工程改造之建構體。在本文中所描述之一實施例中，細胞（例如，T細胞）係經反轉錄病毒載體（例如， $\gamma$ -反轉錄病毒載體）轉導，其編碼如本文所述之經工程改造之抗CD19 CAR。

【0200】 如本文中所使用，用語「反轉錄病毒(retrovirus)」係指將其基因體RNA反轉錄成直鏈雙股DNA副本隨後將其基因體RNA共價整合至宿主基因體之RNA病毒。適用於一些實施例之說明性反轉錄病毒包括但不限於：莫洛尼氏鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼氏鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈威(Harvey)鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳房腫瘤病毒(MuMTV)、長臂猿白血病病毒(GaLV)、貓白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗蘭德(Friend)鼠白血病病毒、鼠幹細胞病毒(MSCV)及勞氏肉瘤病毒(RSV)及慢病毒。

【0201】 如本文所用，用語「慢病毒(lentivirus)」係指複合物反轉錄病毒之群（或屬）。說明性慢病毒包括但不限於：HIV（人類免疫缺陷病毒；包括HIV類型1及HIV類型2）；梅迪－威司奈(visna-maedi)病毒(VMV)；山羊關節炎腦炎病毒(CAEV)；馬傳染性貧血病毒(EIAV)；貓免疫缺陷病毒(FIV)；牛免疫缺陷病毒(BIV)；及猴免疫缺陷病毒(SIV)。

【0202】 用語「載體(vector)」在本文中係指能夠轉移或運輸另一核酸分子之核酸分子。轉移之核酸通常連接至例如插入載體核酸分子中。載體可包括引導細胞中之自主複製之序列，或可包括足以允許整合至宿主細胞DNA之序列。可用載體包括例如質體（例如DNA質體或RNA質體）、轉位子、黏接質體、細菌人工染色體、及病毒載體。可用病毒載體包括例如複製缺陷反轉錄病毒及慢病毒。

【0203】 如所屬技術領域中具有通常知識者將顯而易見，用語「病毒載體」係廣泛用以指包括一般促進核酸分子之轉移或整合至細胞基因體中的病毒衍生核酸元件之核酸分子（例如轉移質體），或指介導核酸轉移之病毒顆粒。除了（多種）核酸外，病毒顆粒一般將包括各種病毒組分，且有時亦包括宿主細胞組分。

【0204】 用語病毒載體可指能夠將核酸轉移至細胞中之病毒或病毒顆粒、或經轉移之核酸本身。病毒載體及轉移質體含有主要衍生自病毒之結構及/或功能基因元件。用語「反轉錄病毒載體(retroviral vector)」係指含有主要衍生自反轉錄病毒之結構及功能基因元件或其部分之病毒載體或質體。用語「慢病毒載體(lentiviral vector)」係指含有主要衍生自慢病毒之結構及功能基因元件或其部分（包括LTR）之病毒載體或質體。用語「混合載體(hybrid vector)」係指

含有反轉錄病毒（例如慢病毒）序列及非反轉錄病毒序列之載體、LTR或其他核酸。在一個實施例中，混合載體係指包含用於反轉錄、複製、整合、及/或包裝之反轉錄病毒（例如慢病毒）序列的載體或轉移質體。

**【0205】** 在一些實施例中，用語「慢病毒載體」、「慢病毒表現載體(lentiviral expression vector)」可用以指慢病毒轉移質體及/或傳染性慢病毒顆粒。在本文中提及元件（諸如選殖位點、啟動子、調節元件、異源核酸等）之情況下，應理解此等元件之序列以RNA形式存在於本揭露之慢病毒顆粒中，且以DNA形式存在於本揭露之DNA質體中。在本文所述之一個實施例中，表現載體係慢病毒表現載體。

**【0206】** 在前病毒之各端處係稱作「長末端重複序列(long terminal repeat)」或「LTR」之結構。用語「長末端重複序列(LTR)」係指位於反轉錄病毒DNA之端部處之鹼基對之域，該等域在其天然序列背景下係直接重複序列且含有U3、R、及U5區。LTR通常提供對反轉錄病毒基因之表現（例如基因轉錄之促進、起始及多腺苷化）及病毒複製之基本功能。該LTR含有許多調節信號，包括轉錄控制元件、多腺苷化信號、及用於病毒基因體之複製及整合所需之序列。病毒LTR分成稱為U3、R、及U5之三個區。U3區含有增強子及啟動子元件。U5區係引子結合位點與R區之間之序列且含有多腺苷化序列。R（重複）區係側接U3及U5區。LTR由U3、R、及U5區構成，且在病毒基因體之5'及3'端二者處出現。相鄰於5' LTR係基因體（tRNA引子結合位點）之反轉錄及病毒RNA有效包裝成顆粒（Psi位點）所必需之序列。

**【0207】** 如本文中所使用，用語「包裝信號(packaging signal)」或「包裝序列(packaging sequence)」係指位於反轉錄病毒基因體內之序列，需要該等序

列將病毒RNA插入病毒殼體或顆粒中，參見例如Clever et al., 1995. J of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101–2109。數種反轉錄病毒載體使用病毒基因體殼體化(encapsidation)所需之最小包裝信號（亦稱為psi ['P]序列）。因此，如本文中所使用，用語「包裝序列」、「包裝信號」、「psi」、及符號「P」係用以指稱在病毒顆粒形成期間反轉錄病毒RNA股之殼體化所需之非編碼序列。

**【0208】** 在各種實施例中，載體包含經修飾之5' LTR及/或3' LTR。LTR中之任一者或兩者可包含一或多個修飾，包括但不限於一或多個去除、插入或取代。通常對3' LTR進行修飾以藉由使病毒複製缺陷來改善慢病毒或反轉錄病毒系統之安全性。如本文中所使用，用語「複製缺陷(replication-defective)」係指不能完全有效複製使得未產生傳染性病毒粒子之病毒（例如複製缺陷慢病毒後代）。用語「複製勝任(replication-competent)」係指能夠複製使得病毒之病毒複製能夠產生傳染性病毒粒子之野生型病毒或突變型病毒（例如複製勝任慢病毒後代）。

**【0209】** 「自失活(self-inactivating)」(SIN)載體係指複製缺陷載體，例如反轉錄病毒或慢病毒載體，其中右(3') LTR增強子-啟動子區（稱作U3區）已經修飾（例如藉由去除或取代）以防止病毒轉錄超過第一輪病毒複製。此係因為右(3') LTR U3區係在病毒複製期間用作左(5') LTR U3區之模板，且因此，不可在無U3增強子-啟動子下進行病毒轉錄。在本揭露之另一實施例中，3'LTR經修飾使得U5區例如經理想poly(A)序列置換。應注意，在本文中亦涵蓋對LTR之修飾，諸如對3'LTR、5'LTR、或3'及5'LTR二者之修飾。

**【0210】** 額外安全性增強係藉由將5'LTR之U3區用異源啟動子置換以在病毒顆粒產生期間驅動病毒基因體之轉錄來提供。可使用之異源啟動子之實例

包括例如病毒性猴病毒40 (SV40) (例如早期或晚期)、巨細胞病毒(CMV) (例如立即早期)、莫洛尼氏鼠白血病病毒(MoMLV)、勞氏肉瘤病毒(RSV)、及單純疱疹病毒(HSV) (胸苷激酶) 啟動子。典型啟動子能夠以Tat非依賴性方式驅動高水平轉錄。此置換降低重組以產生複製勝任病毒之概率，因為病毒產生系統中不存在完整U3序列。在某些實施例中，異源啟動子具有控制病毒基因體轉錄之方式的額外優勢。舉例而言，異源啟動子可係可誘導，使得病毒基因體之所有或部分之轉錄僅在誘導因子存在時發生。誘導因子包括但不限於一或多種化學化合物或生理條件，諸如培養宿主細胞之溫度或pH。

【0211】 在一些實施例中，病毒載體包含TAR元件。用語「TAR」係指位於慢病毒 (例如HIV) LTR之R區中之「反式活化反應(trans-activation response)」基因元件。此元件與慢病毒反式活化子(tat)基因元件交互作用以增強病毒複製。

【0212】 「R區(R region)」係指在封端基團開始 (即轉錄開始) 時開始且在poly A束開始之前立即結束之反轉錄病毒LTR內之區。R區亦定義為側接U3及U5區。R區在反轉錄期間於許可初生DNA自基因體之一端轉移至另一端中起作用。

【0213】 如本文中所使用，用語「FLAP元件(FLAP element)」係指核酸，其序列包括反轉錄病毒 (例如HIV-1或HIV-2) 之中心多嘔呤束及中心終止序列 (cPPT及CTS)。適合的FLAP元件係描述於美國專利第6,682,907號、及Zennou, et al., 2000, Cell, 101: 173中。在HIV-1反轉錄期間，正股DNA在中心多嘔呤束(cPPT)處之中心啟動及在中心終止序列(CTS)處之中心終止導致三股

DNA結構：HIV-I中心DNA瓣之形成。儘管不希望受任何理論束縛，但DNA瓣可作用為慢病毒基因體核輸入之順式活化決定位及/或可增加病毒之效價。

**【0214】** 在一個實施例中，反轉錄病毒或慢病毒轉移載體包含一或多個輸出元件。用語「輸出元件(export element)」係指順式作用轉錄後調節元件，其調節RNA轉錄本自細胞核至細胞質的運輸。RNA輸出元件之實例包括但不限於人類免疫缺陷病毒(HIV) rev反應元件(RRE)（參見例如Cullen et al., 1991. J Virol. 65: 1053;及Cullen et al., 1991. Cell 58: 423）及B型肝炎病毒轉錄後調節元件(HPRE)。一般而言，將RNA輸出元件置放於基因之3' UTR內，且可作為一或多個副本插入。

**【0215】** 在其他實施例中，病毒載體中之異源序列之表現藉由將轉錄後調節元件、有效多腺苷化位點、及可選地轉錄終止信號併入載體中增加。各種轉錄後調節元件可增加異源核酸在蛋白質處之表現，例如伍德查克(woodchuck)肝炎病毒轉錄後調節元件(WPRE; Zufferey et al., 1999, J Virol., 73:2886)；B型肝炎病毒中存在之轉錄後調節元件(HPRE) (Huang et al., Mol. Cell. Biol., 5:3864)；及類似者(Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766)。

**【0216】** 在一些實施例中，載體可包括具有轉錄或轉譯調節活性之調節性寡核苷酸。此類寡核苷酸可用於調節表現之控制之各種基因表現組態中。轉錄調控寡核苷酸可增加（增強）或減少（靜默）重組表現構築體之表現水平。調節性寡核苷酸可以特定方式選擇性調節表現，包括例如賦予組織特異性、發育階段特異性、或多核苷酸之相似表現（包括構成或可誘導表現）。本揭露之調節性寡核苷酸亦可為包含操作地連接至可表現多核苷酸之調節性寡核苷酸之

表現載體或重組核酸分子之組分。調節性元件可係自幾個核苷酸至幾百個核苷酸之各種長度。

**【0217】** 引導異源核酸轉錄本之有效終止及多腺苷化之元件會增加異源基因表現。轉錄終止信號通常發現在多腺苷化信號之下游。在一些實施例中，載體包含編碼待表現之多肽之多核苷酸之多腺苷化序列3'。如本文中所示，用語「poly A位點」或「poly A序列」表示引導初生RNA轉錄本藉由RNA聚合酶II終止及多腺苷化二者之DNA序列。多腺苷化序列可藉由添加poly A尾至編碼序列之3'端促進mRNA穩定性，且因此促成轉譯效率增加。重組轉錄本之有效多腺苷化係所欲的，因為缺少poly A尾之轉錄本係不穩定且經快速降解。可用於本揭露之載體中之poly A信號之說明性實例包括理想poly A序列（例如AATAAA、ATTAAA、AGTAAA）、牛生長激素poly A序列(BGHpA)、兔 $\beta$ -球蛋白poly A序列(r $\beta$ gpA)、或所屬技術領域中已知之另一適合的異源或內源性poly A序列。

**【0218】** 本文亦描述「密碼子最佳化(codon-optimized)」核酸。「密碼子最佳化」核酸係指已改變之核酸序列，使得密碼子在特定系統（諸如特定物種或物種群組）中之表現係最佳的。舉例而言，可藉由用在物種的基因中更頻繁或最頻繁地使用之密碼子替換原生序列之至少一個、多於一個、或顯著數量之密碼子來最佳化核酸序列，以在哺乳動物細胞或特定哺乳動物物種（諸如人類細胞）中表現。密碼子最佳化不改變經編碼蛋白質之胺基酸序列。

**【0219】** 存在於本揭露中之密碼子最佳化核苷酸序列可存在與表現功效相關之改善性質。在一些實施例中，可最佳化待轉錄之DNA序列以促進更有效轉錄及/或轉譯。在一些實施例中，DNA序列可針對順式調節元件（例如，

TATA盒、終止信號、及蛋白質結合位點)、人工重組位點、chi位點、CpG二核苷酸含量、陰性CpG島、GC含量、聚合酶滑移位點、及/或相關於轉錄之其他要件進行最佳化；DNA序列可針對隱蔽剪接位點、mRNA二級結構、mRNA之穩定自由能、重複序列、RNA不穩定模體、及/或與mRNA處理及穩定性相關之其他要件進行最佳化；DNA序列可針對密碼子使用偏壓、密碼子可調適性、內部chi位點、核糖體結合位點(例如IRES)、早期polyA位點、Shine-Dalgarno (SD)序列、及/或相關於轉譯之其他要件進行最佳化；及/或DNA序列可針對密碼子上下文、密碼子-反密碼子交互作用、轉譯暫停位點、及/或與蛋白質摺疊相關之其他要件進行最佳化。

**【0220】** 載體可具有一或多個LTR，其中任何LTR包含一或多個修改，諸如一或多個核苷酸取代、添加、或缺失。載體可進一步包含更多輔助元件中之一者以增加轉導效率(例如cPPT/FLAP)、病毒包裝(例如Psi(Ψ)包裝信號、RRE)，及/或增加治療性基因表現之其他元件(例如poly(A)序列)，且可以可選地包含WPRE或HPRE。具有通常知識者應瞭解，許多其他不同實施例可自本揭露之現有實施例中形成。

**【0221】** 「宿主細胞(host cell)」包括於體內、離體、或體外用本揭露之重組載體或多核苷酸轉染、感染、或轉導之細胞。宿主細胞可包括包裝細胞、生產細胞、及感染病毒載體之細胞。在一些實施例中，向需要療法之對象投予感染本揭露之病毒載體之宿主細胞。在某些實施例中，用語「目標細胞(target cell)」與宿主細胞可互換使用，且指所欲細胞類型之經轉染、感染、或轉導細胞。在一些實施例中，目標細胞係T細胞。

【0222】 通常需要大規模病毒顆粒產生以達到合理病毒力價。病毒顆粒係藉由將轉移載體轉染至包含病毒結構及/或輔助基因之包裝細胞系中而產生，例如gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpx、或nef基因或其他反轉錄病毒基因。

【0223】 如本文中所使用，用語「包裝載體(packaging vector)」係指缺乏包裝信號之表現載體或病毒載體，且包含編碼一、二、三、四個或更多個病毒結構及/或輔助基因之多核苷酸。一般而言，包裝載體係包括於包裝細胞中，且係經由轉染、轉導、或感染引入細胞中。轉染、轉導、或感染之方法係所屬技術領域中具有通常知識者所熟知。本揭露之反轉錄病毒/慢病毒轉移載體可經由轉染、轉導、或感染引入包裝細胞系中，以產生生產細胞或細胞系。本揭露之包裝載體可藉由常見方法引入人類細胞或細胞系中，包括例如磷酸鈣轉染、脂質轉染、或電穿孔。在一些實施例中，包裝載體係與顯性可選擇標記一起引入細胞中，諸如新黴素、潮黴素、嘌呤黴素、殺稻瘟菌素(blastocidin)、吉歐黴素(zeocin)、胸苷激酶、DHFR、Gln合成酶、或ADA，接著在適當藥物之存在下選擇並分離殖株。可選擇標記基因可實體地連接至由包裝載體編碼之基因，例如由IRES或自裂解病毒肽。

【0224】 病毒套膜蛋白質(env)判定宿主細胞之範圍，其可能最終藉由自細胞系產生之重組反轉錄病毒感染及轉化。在慢病毒（諸如HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、及EIV）之情況下，env蛋白質包括gp41及gp120。在一些實施例中，由本揭露之包裝細胞表現之病毒env蛋白在與病毒gag及pol基因分開的載體上編碼，如先前已描述。

**【0225】** 可在本文所描述之實施例中使用的反轉錄病毒衍生之env基因之說明性實例包括但不限於：MLV套膜、IOAI套膜、BAEV、FeLV-B、RDI 14、SSAV、Ebola、仙台病毒、FPV（雞瘟病毒）、及流感病毒套膜。類似地，可利用編碼自RNA病毒（例如，小核糖核酸病毒科(Picomaviridae)、杯狀病毒科(Calciviridae)、星狀病毒科(Astroviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、黃病毒科(Flaviviridae)、冠狀病毒科(Coronaviridae)、副黏病毒科(Paramyxoviridae)、彈狀病毒科(Rhabdoviridae)、絲狀病毒科(Filoviridae)、正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)、布尼亞病毒科(Bunyaviridae)、沙粒病毒科(Arenaviridae)、呼腸孤病毒(Reoviridae)、雙鏈RNA病毒科(Bimaviridae)、反轉錄病毒科(Retroviridae)之RNA病毒科)以及自DNA病毒（肝去氧核糖核酸病毒科(Hepadnaviridae)、圓環病毒科(Circoviridae)、微小病毒科(Parvoviridae)、乳多空病毒科(Papovaviridae)、腺病毒(Adenoviridae)、疱疹病毒(Herpesviridae)、痘病毒科(Poxyiridae)、及虹彩病毒科(Iridoviridae)）之套膜之基因。代表性實例包括FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、Rabies、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、AEV、AMV、CTIO、及EIAV。

**【0226】** 在其他實施例中，用於假型化本揭露之病毒之套膜蛋白包括但不限於以下病毒中之任一者：A型流感病毒（諸如H1N1、H1N2、H3N2、及H5N1（禽流感））、B型流感病毒、C型流感病毒、A型肝炎病毒、B型肝炎病毒、C型肝炎病毒、D型肝炎病毒、E型肝炎病毒、輪狀病毒、諾沃克(Norwalk)病毒群之任何病毒、腸道腺病毒、小病毒、登革熱病毒、猴痘、單股負鏈病毒(Mononegavirale)、狂犬病病毒屬(Lyssavirus)（諸如狂犬病病毒、拉哥斯(Lagos)

蝙蝠病毒、莫柯拉(Mokola)病毒、杜文黑基(Duvenhage)病毒、歐洲蝙蝠病毒1及2及澳大利亞蝙蝠病毒、短暫熱病毒屬(Ephemerovirus)、水疱性病毒屬(Vesiculovirus)、水疱性口炎病毒(VSV)、疱疹病毒(諸如單純疱疹病毒1型及2型)、水痘帶狀疱疹、巨細胞病毒、埃-巴二氏病毒(EBV)、人類疱疹病毒(HHV)、人類疱疹病毒6型及8型、人類免疫缺陷病毒(HIV)、乳頭狀瘤病毒、鼠 $\gamma$ 疱疹病毒、沙粒狀病毒(諸如阿根廷出血熱病毒、玻利維亞出血熱病毒、沙比亞相關出血熱病毒、委內瑞拉出血熱病毒、拉沙熱病毒、馬丘波病毒)、淋巴細胞脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)、布尼亞病毒(諸如克里米亞-剛果出血熱病毒)、漢他病毒(hantavirus)、引起腎衰竭的出血熱病毒、裂谷熱病毒、包括埃博拉(Ebola)出血熱及馬爾堡(Marburg)出血熱等的絲狀病毒科(filovirus)、Kyasanur森林病病毒的黃病毒科、鄂木斯克(Omsk)出血熱病毒、蜱傳腦炎病毒及副黏液病毒科(諸如亨德拉(Hendra)病毒及尼帕(Nipah)病毒)、大天花及小天花(天花)、 $\alpha$ 病毒諸如委內瑞拉馬腦炎病毒、東部馬腦炎病毒、西部馬腦炎病毒、SARS相關冠狀病毒(SARS-Co V)、西尼羅河病毒、或任何引起腦炎的病毒。

**【0227】** 如本文所用，用語「假型(pseudotype)」或「假型化(pseudotyping)」係指一種病毒，其病毒套膜蛋白已被另一種具有其他特徵的病毒套膜蛋白取代。舉例而言，HIV可能被水疱性口炎病毒G-蛋白質(VSV-G)套膜蛋白質假型化，使HIV感染較廣範圍之細胞，因為HIV套膜蛋白質(藉由env基因編碼)通常將病毒靶向CD4+呈現細胞。

**【0228】** 如本文中所使用，用語「包裝細胞系(packaging cell line)」係用以指稱不含有包裝信號之細胞系，但穩定或暫時性表現正確包裝病毒顆粒所必

需之病毒結構蛋白及複製酶（例如gag、pol、及env）。可採用任何合適的細胞系以製備本揭露之包裝細胞。一般而言，細胞係哺乳動物細胞。在另一實施例中，用以產生包裝細胞系之細胞係人類細胞。可用以產生包裝細胞系之合適細胞系包括例如CHO細胞、BHK細胞、MDCK細胞、C3H 10TI/2細胞、FLY細胞、Psi-2細胞、BOSC 23細胞、P A317細胞、WEHI細胞、COS細胞、BSC 1細胞、BSC 40細胞、BMT 10細胞、VERO細胞、W138細胞、MRC5細胞、A549細胞、HTI080細胞、293細胞、293T細胞、B-50細胞、3T3細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、Saos-2細胞、Huh7細胞、HeLa細胞、W163細胞、211細胞、及211A細胞。

**【0229】** 如本文中所使用，用語「生產細胞系(producer cell line)」係指能夠產生重組反轉錄病毒顆粒之細胞系，包含包裝細胞系及包含包裝信號之轉移載體構築體。傳染性病毒顆粒及病毒儲備溶液之產生可使用習知技術進行。製備病毒儲備液之方法係所屬技術領域中已知的，且藉由例如Y. Soneoka et al.(1995) Nucl. Acids Res. 23:628–633、及N. R. Landau et al.(1992) J Virol. 66:5110–5113說明。可使用習知技術自包裝細胞收集傳染性病毒顆粒。例如，可藉由細胞裂解或收集細胞培養物之上清液來收集傳染性顆粒，如所屬技術領域中已知。可選地，若為所欲，可純化所收集之病毒顆粒。合適的純化技術係所屬技術領域中具有通常知識者所熟知。

**【0230】** 使用反轉錄病毒或慢病毒載體藉助於病毒感染而非轉染遞送基因或其他多核苷酸序列稱為「轉導」。在一個實施例中，通過感染及前病毒整合將反轉錄病毒載體轉導至細胞中。在某些實施例中，若目標細胞（例如T細胞）包含藉由使用病毒或反轉錄病毒載體感染遞送至細胞之基因或其他多核苷

酸序列，則目標細胞係「經轉導」。在一些實施例中，經轉導細胞包含在其細胞基因體中藉由反轉錄病毒或慢病毒載體遞送之一或多種基因或其他多核苷酸序列。

**【0231】** 在一些實施例中，宿主細胞表現本揭露之構築體中之一或多者（例如抗CD19 CAR）。可向對象投予宿主細胞以治療及/或預防T細胞惡性腫瘤。可根據本揭露之某些實施例使用的在基因療法中使用之病毒載體相關之其他方法，可見於例如Kay, M.A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.): 138S–142S; Ferry, N. and Heard, J.M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975–81; Shiratory, Y. et al., (1999) *Liver* 19:265–74; Oka, K. et al., (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179–86; Thule, P. M. and Liu, J.M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744–52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335–56; Alt, M. (1995) *J Hepatol.* 23:746–58 ; Brody, S. L. and Crystal, R.G. (1994) *Ann. NY Acad. Sci.* 716:90–101 ; Strayer, D.S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159–2172; Smith–Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43–49 ; 及Lee, H. C. et al., (2000) *Nature* 408:483–8。

**【0232】** 除引入CAR之外，本揭露之經工程改造T細胞可進一步經工程改造以減少及/或消除TCR $\alpha$ 及B2M之表現，例如使用靶向TRAC及B2M基因之一或多個ZFN或CRISPR/sgRNA。應理解，被ZFN靶向之細胞的子代本身可不包含本文所述之分子、多核苷酸、及/或載體，但在此等細胞中TCR及/或B2M基因不活化。

**【0233】** 本文所描述之組成物可包含如本文所涵蓋之T細胞組成物。本文中所述之一實施例係組成物，其包含表現及抗CD19 CAR之經修飾T細胞，其中TCR及B2M之表現（諸如可偵測之表面表現）已減少及/或消除。組成物包

括但不限於醫藥組成物。「醫藥組成物(pharmaceutical composition)」係指配製在醫藥學上可接受或生理學上可接受之溶液之組成物，其用於單獨或與一或多種其他療法組合投予至細胞或動物。亦應理解，若所欲，本揭露之組成物可與其他藥劑組合投予，諸如例如細胞介素、生長因子、激素、小分子、化學治療劑、前藥、藥物、抗體、或其他各種醫藥學上活性劑。亦不限於可包括在組成物中之其他組分，其限制條件係額外藥劑不會不利地影響組成物遞送預期療法之能力。

**【0234】** 本文中使用的詞組「醫藥學上可接受之(pharmaceutically acceptable)」係指在合理的醫療判斷範疇內適合於與人類及動物之組織接觸與合理的效益/風險比相符而不具有過量毒性、刺激、過敏反應、或其他問題或併發症之彼等化合物、材料、組成物、及/或劑型。

**【0235】** 如本文所用，「醫藥上可接受之賦形劑、載劑、稀釋劑、或賦形劑(pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient)」包括但不限於任何的佐藥、載劑、賦形劑、助滑劑、甜味劑、稀釋劑、防腐劑、染料/著色劑、增味劑、界面活性劑、潤濕劑、分散劑、懸浮劑、穩定劑、等張劑、溶劑、界面活性劑、或乳化劑，其已經美國食品藥物管理局(United States Food and Drug Administration)核准可用於人類或馴養動物。例示性醫藥上可接受之載劑包括但不限於糖，諸如乳糖、葡萄糖及蔗糖；澱粉，諸如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，諸如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素、及乙酸纖維素；西黃蓍膠；麥芽；明膠；滑石；可可脂、蠟、動物及植物脂肪、石蠟、聚矽氧、皂土、矽酸、氧化鋅；油，諸如花生油、棉籽油、紅花子油、芝麻油、橄欖油、玉米油、及黃豆油；二醇，諸如丙二醇；多元醇，諸如甘油、山梨醇、甘露

醇、及聚乙二醇；酯，諸如油酸乙酯及月桂酸乙酯；洋菜；緩衝劑，諸如氫氧化鎂及氫氧化鋁；藻酸；無致熱原的水；等張鹽水；林格氏液；乙醇；磷酸鹽緩衝溶液；及醫藥配方中採用的任何其他相容物質。

**【0236】** 在本文所述之一個實施例中，本揭露之組成物包含本文所涵蓋之經修飾之T細胞之量。通常可以說明，包含本文所涵蓋之T細胞之醫藥組成物可以 $10^2$ 至 $10^{10}$ 個細胞/kg體重、 $10^5$ 至 $10^9$ 個細胞/kg體重、 $10^5$ 至 $10^8$ 個細胞/kg體重、 $10^5$ 至 $10^7$ 個細胞/kg體重、 $10^7$ 至 $10^9$ 個細胞/kg體重、或 $10^7$ 至 $10^8$ 個細胞/kg體重（包括彼等範圍內之所有整數值）之劑量投予。細胞數目將取決於組成物之最終用途以及其中所包括之細胞類型。T細胞經修飾以表現經工程改造之TCR或CAR可以此等範圍內之劑量多次投予。細胞對進行療法之患者可係同種異體、同系(syngeneic)、異種、或自體的。若為所欲，治療亦可包括投予如本文所述之促分裂原（例如PHA）或淋巴激素、細胞介素、及/或趨化因子（例如IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-18、及TNF- $\beta$ 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 $\alpha$ 等），以增強輸注T細胞之植入及功能。

**【0237】** 大致上，包含如本文所述活化及擴增之細胞的組成物可用於治療及預防免疫功能不全或免疫抑制之個體中產生之疾病。在一些情況下，包含本文所涵蓋之經修飾之T細胞之組成物用於治療癌症。本文所述之經修飾之T細胞可單獨投予，或作為醫藥組成物與載劑、稀釋劑、賦形劑、及/或其他組分（諸如IL-2、IL-7、及/或IL-15）、或其他細胞介素或細胞群組合投予。在一些實施例中，本文所涵蓋之醫藥組成物包含與一或多種醫藥學或生理學上可接受之載劑、稀釋劑、或賦形劑組合之經基因修飾之T細胞之量。

**【0238】** 包含本文所涵蓋之經修飾之T細胞之醫藥組成物可進一步包含緩衝液，諸如中性緩衝鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、及類似物；碳水化合物，諸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖、或聚葡糖、甘露醇；蛋白質；多肽或胺基酸，諸如甘胺酸；抗氧化劑；螯合劑，諸如EDTA或麩胱甘肽；佐劑（例如氫氧化鋁）；及防腐劑。本揭露之組成物可經調配用於腸胃外投予，例如血管內（靜脈內或動脈內）、腹膜內或肌肉內投予。

**【0239】** 液體醫藥組成物（無論是溶液、懸浮液、或其他類似之形式）均可包括下列之一或多者：無菌稀釋劑（諸如用於注射之水）、鹽水溶液，諸如生理鹽水、林格氏溶液、等張氯化鈉、不揮發油（諸如可充當溶劑或懸浮介質之合成單甘油酯或二甘油酯）、聚乙二醇、甘油、丙二醇、或其他溶劑；抗菌劑，諸如苯甲醇或對羥苯甲酸甲酯；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸；緩衝劑，諸如乙酸鹽、檸檬酸鹽、或磷酸鹽，以及用於調節張力之試劑，諸如氯化鈉或右旋糖。腸胃外製劑可封閉在安瓿、拋棄式注射器、或由玻璃或塑膠製成之多劑量小瓶中。亦包括無菌可注射醫藥組成物。

**【0240】** 在一些實施例中，本文所涵蓋之組成物包含單獨或與一或多種治療劑組合之經擴增修飾之T細胞組成物之有效量。因此，T細胞組成物可單獨或與其他已知癌症治療組合投予，諸如輻射療法、化學療法、移植、免疫療法、激素療法、光動力療法等。組成物亦可與抗生素及抗病毒劑組合投予。此項技術中可接受此類治療劑作為如本文所述之疾病狀態（諸如癌症）之治療。在一個實施例中，本文所涵蓋之組成物亦可與TGF- $\beta$ 之抑制劑（例如小分子抑制劑LY55299）投予。所涵蓋之例示性治療劑包括細胞介素、生長因子、類固

醇、NSAID、DMARD、消炎劑、化學治療劑、放射治療劑、治療性抗體、或其他活性及輔助劑。

【0241】 在某些實施例中，包含本文中所涵蓋之T細胞之組成物可結合任何數目的化學治療劑來投予。化學治療劑之說明性實例包括但不限於烷化劑，諸如噻替派及環磷醯胺(CYTOXAN™)；烷基磺酸酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)、及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥多巴(meturedopa)、及優瑞多巴(uredopa)；伸乙亞胺及甲基蜜胺(methylamelamine)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺(triethylenephosphoramidate)、三伸乙基硫代磷醯胺(triethylenethiophosphoramidate)、及三經甲基三聚氰胺(trimethylololomelamine resume)；氮芥子氣，諸如氯芥苯丁酸、萘氮芥(chloromaphazine)、氯磷醯胺(chlorophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、二氯甲基二乙胺氧化物鹽酸鹽、黴法蘭(melphalan)、新恩比興(novembichin)、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、氯乙環磷醯胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲(nitrosurea)，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如阿克拉黴素(aclacinomysins)、放線菌素(actinomycin)、安麴黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸、博萊黴素、放線菌素C(cactinomycin)、卡奇黴素(calicheamicin)、卡拉比星(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、放線菌素D

(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、阿黴素(doxorubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、泊非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎拉黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如胺甲喋呤及5-氟脲嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如二甲葉酸(denopterin)、胺甲喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如環胞苷(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-硫脲嘧啶、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二去氧尿苷、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、5-FU；雄性激素，諸如卡魯甾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone)；抗腎上腺劑，諸如胺麩精(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolic acid)；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；安吡啶(amsacrine)；倍曲布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；埃夫咪辛(elformithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥

基尿素；蘑菇多糖(lentinan)；氯尼達明(lonidamine)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidamol)；二胺硝吡啶(nitracrine)；噴司他汀(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®；雷佐生(razoxane)；西索菲蘭(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2"三氯三乙胺；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴仁；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；伽托辛(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；類紫杉醇，例如紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)及多西他賽(docetaxel) (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；氯芥苯丁酸；吉西他濱；6-硫鳥嘌呤；巯嘌呤；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑及卡鉑；長春鹼；鉑；依託泊苷(VP-16)；依弗醯胺；絲裂黴素C (mitomycin C)；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)；長春瑞濱(vinorelbine)；溫諾平(navelbine)；諾安托(novantrone)；替尼泊苷；道諾黴素(daunomycin)；胺喋呤；截瘤達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑RPS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；視網酸衍生物，諸如Targretin™ (貝瑟羅汀(bexarotene))、Panretin™ (阿利維A酸(alitretinoin))；ONTAK™ (地尼白介素(denileukin diftitox))；埃斯培拉黴素(esperamicin)；卡培他濱；及以上任一者之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物。該定義亦包括抗荷爾蒙劑，其作用為調控或抑制對腫瘤之荷爾蒙作用，諸如抗雌激素，包括例如泰莫西芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羥基泰莫昔芬(4-

hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、克沃昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)、及托瑞米芬(toremifene) (Fareston)；及抗雄性激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、柳菩林(leuprolide)、及戈舍瑞林(goserelin)；及以上任一者之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物。

**【0242】** 可結合本文中所述之組成物使用各種其他治療劑。在一個實施例中，包含T細胞之組成物係與抗發炎劑一起投予。消炎劑或藥物包括但不限於類固醇及糖皮質激素（包括倍他米松(betamethasone)、布地奈德(budesonide)、地塞米松(dexamethasone)、乙酸氫化可體松(hydrocortisone acetate)、氫化可體松(hydrocortisone)、氫化可體松、甲基潑尼松龍(methylprednisolone)、潑尼松龍(prednisolone)、潑尼松(prednisone)、曲安奈德(triamcinolone)），非類固醇消炎藥物(NSAIDS)包括阿司匹靈、伊布洛芬、萘普生(naproxen)、胺甲喋呤、柳氮磺胺吡啶、來氟米特(leflunomide)、抗TNF藥物、環磷醯胺、及黴酚酸酯。

**【0243】** 在一些實施例中，NSAID係選自由以下組成之群組：伊布洛芬、萘普生、萘普生鈉、Cox-2抑制劑（諸如VIOXX® (rofecoxib)及CELEBREX® (celecoxib)）、及唾液酸鹽。例示性止痛劑係選自由以下組成之群組：乙醯胺酚、羥考酮、特拉嗎竇、或鹽酸丙氧芬(proporxyphene hydrochloride)。例示性糖皮質素係選自由以下組成之群組：可體松、地塞米松、氫化可體松、甲基潑尼松龍、潑尼松龍、或潑尼松。例示性生物反應調節劑包括針對細胞表面標記（例如CD4、CD5等）之分子、細胞介素抑制劑（諸如TNF拮抗劑（例如依那西普(etanercept) (ENBREL®)）、阿達木單抗

(adalimumab) (HUMIRA®)、及英夫利昔單抗(infliximab) (REMICADE®))、趨化因子抑制劑、及黏附分子抑制劑。生物反應調節劑包括單株抗體以及分子之重組形式。例示性疾病修飾抗風濕藥物(DMARD)包括硫唑嘌呤、環磷醯胺、環孢素、胺甲喋呤、青黴胺、來氟米特、柳氮磺胺吡啶、羥氯喹、金（口服金諾芬(auranofin)及肌內）、及米諾四環素。

【0244】 在其他實施例中，適用與本文所涵蓋之經CAR修飾之T細胞組合的治療性抗體包括但不限於阿巴伏單抗(abagovomab)、阿德木單抗(adecatumumab)、阿夫妥珠單抗(afutuzumab)、阿侖單抗(alemtuzumab)、阿妥莫單抗(altumomab)、阿麥妥昔單抗(amatuximab)、安那莫單抗(anatumomab)、阿西莫單抗(arcitumomab)、巴維昔單抗(bavituximab)、貝妥莫單抗(bectumomab)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、比伐珠單抗(bivatuzumab)、蘭妥莫單抗(blinatumomab)、本妥昔單抗(brentuximab)、坎妥珠單抗(cantuzumab)、卡妥索單抗(catumaxomab)、西妥昔單抗(cetuximab)、西他妥珠單抗(citatumomab)、西妥木單抗(cixutumumab)、克里伏妥珠單抗(clivatuzumab)、康納木單抗(conatumumab)、達他單抗(daratumumab)、德珠單抗(drozitumab)、杜里土單抗(duligotumab)、杜西吉土單抗(dusigitumab)、地莫單抗(detumomab)、達西珠單抗(dacetuzumab)、達洛珠單抗(dalotuzumab)、依美昔單抗(ecromeximab)、埃羅妥珠單抗(elotuzumab)、恩司昔單抗(ensituximab)、鄂托默單抗(ertumaxomab)、埃達珠單抗(etaracizumab)、法瑞妥珠單抗(farietuzumab)、費拉妥珠單抗(ficlatuzumab)、非吉單抗(figitumumab)、法蘭土單抗(flanvotumab)、弗妥昔單抗(futuximab)、加尼圖單抗(ganitumab)、吉妥珠單抗(gemtuzumab)、吉瑞昔單抗(girentuximab)、格雷巴土木單抗(glembatumumab)、

替伊莫單抗(ibritumomab)、伊戈伏單抗(igovomab)、伊姆加土珠單抗  
(imgatuzumab)、因達西單抗(indatuximab)、英妥珠單抗(inotuzumab)、英妥木單  
抗(intetumumab)、伊匹單抗(ipilimumab)、伊妥木單抗(iratumumab)、拉貝珠單  
抗(labetuzumab)、來沙木單抗(lexatumumab)、林妥珠單抗(lintuzumab)、洛瓦土  
珠單抗(lorvotuzumab)、魯卡木單抗(lucatumumab)、馬帕木單抗  
(mapatumumab)、馬妥珠單抗(matuzumab)、米拉珠單抗(milatuzumab)、明瑞莫  
單抗(minretumomab)、米妥莫單抗(mitumomab)、莫塞妥莫單抗  
(moxetumomab)、納那妥單抗(namatumab)、那莫單抗(naptumomab)、奈昔木單  
抗(necitumumab)、尼妥珠單抗(nimotuzumab)、諾莫單抗(nofetumomab)、奧卡  
妥珠單抗(ocaratumumab)、奧法木單抗(ofatumumab)、奧拉單抗(olaratumab)、奧  
那組單抗(onartuzumab)、奧普珠單抗(oportuzumab)、奧戈伏單抗  
(oregovomab)、帕尼單抗(panitumumab)、帕薩珠單抗(parsatumumab)、帕曲妥單  
抗(patritumab)、潘妥莫單抗(pemtumomab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、平妥莫  
單抗(pintumomab)、普托木單抗(pritumumab)、雷妥莫單抗(racotumomab)、雷  
曲妥單抗(radretumab)、利妥木單抗(rilotumumab)、利妥昔單抗(rituximab)、羅  
妥木單抗(robatumumab)、沙妥莫單抗(satumomab)、西羅珠單抗  
(sibrotuzumab)、司妥昔單抗(siltuximab)、辛圖珠單抗(simtuzumab)、索利托單  
抗(solitomab)、他卡珠單抗(tacatumumab)、他普莫單抗(taplutumomab)、泰納莫  
單抗(tenatumomab)、泰普洛單抗(teprotumumab)、替加珠單抗(tigatumumab)、托  
西莫單抗(tositumomab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、土庫珠單抗(tucotuzumab)、  
烏妥昔單抗(ublutumumab)、維妥珠單抗(veltuzumab)、伏司妥珠單抗

(vorsetuzumab)、伏妥莫單抗(votumumab)、紮魯木單抗(zalutumumab)、CC49、及3F8。

**【0245】** 在一些實施例中，本文中所述之組成物係結合細胞介素來投予。如本文中所使用，「細胞介素(cytokine)」意指由一個細胞群釋放且作用於另一細胞而作為細胞間介導物之蛋白質的通用用語。此類細胞介素之實例係淋巴激素、單核因子(monokine)、趨化因子、及傳統多肽激素。細胞介素中包括係生長荷爾蒙，諸如人類生長荷爾蒙、N-甲硫胺醯基人類生長荷爾蒙、及牛生長荷爾蒙；副甲狀腺荷爾蒙；甲狀腺素；胰島素；前胰島素；鬆弛素；前鬆弛素(prorelaxin)；醣蛋白荷爾蒙，諸如濾泡刺激素(FSH)、甲狀腺刺激素(TSH)、及黃體激素(LH)；肝生長因子；纖維母細胞生長因子；泌乳素；胎盤泌乳原；腫瘤壞死因子- $\alpha$ 及- $\beta$ ；密拉氏管抑制物質；小鼠促性腺素相關肽；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；整合素；促血小板生成素(thrombopoietin) (TPO)；神經生長因子，諸如NGF- $\beta$ ；血小板生長因子；轉換生長因子(TGF)，諸如TGF- $\alpha$ 及TGF- $\beta$ ；似胰島素生長因子-I及-II；紅血球生成素(EPO)；骨誘導因子；干擾素，諸如干擾素- $\alpha$ 、- $\beta$ 、及- $\gamma$ ；群落刺激因子(CSF)，諸如巨噬細胞-CSF (M-CSF)；顆粒球-巨噬細胞-CSF (GM-CSF)；及顆粒球-CSF (G-CSF)；介白素(IL)，諸如IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12；IL-15，腫瘤壞死因子，諸如TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ ；及其他多肽因子，包括LIF及kit配體(KL)。如本文中所使用，用語細胞介素包括來自自然來源或重組T細胞培養物之蛋白質、及初始序列細胞介素之生物活性等效物。

【0246】 任何細胞可用作本揭露之多核苷酸、載體、或多肽的宿主細胞。在一些實施例中，細胞可係原核細胞、真菌細胞、酵母細胞、或高等真核細胞，諸如哺乳動物細胞。合適的原核細胞包括但不限於真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸內菌科(*Enterobactehaceae*)，諸如大腸桿菌屬，例如大腸桿菌；腸桿菌屬；伊文氏桿菌屬；克留氏菌屬；變形桿菌屬；沙氏桿菌屬，例如鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)；鋸桿菌屬，例如黏質沙門氏菌(*Serratia marcescans*)、及志賀桿菌(*Shigella*)；桿菌，諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)、及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*)；假單孢菌屬，諸如綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)；及鏈黴菌屬。在一些實施例中，細胞係人類細胞。在一些實施例中，細胞係免疫細胞。

【0247】 在一些實施例中，免疫細胞係選自由下列所組成之群組：T細胞、B細胞、腫瘤浸潤淋巴球(TIL)、TCR表現性細胞、自然殺手(NK)細胞、樹突細胞、顆粒球、先天性淋巴細胞、巨核細胞、單核球、巨噬細胞、血小板、胸腺細胞、及骨髓細胞。在一個實施例中，免疫細胞係經工程改造之同種異體T細胞。不同於抗體療法或獨立的CAR修飾T細胞，T細胞（或如上文所描述之任何細胞）經修飾以表現抗CD19 CAR能夠在活體內複製，且因此促成長期持久性，其可導致持續之癌症療法。

【0248】 在另一實施例中，表現抗CD19 CAR之T細胞可經歷T細胞擴增，使得治療T細胞群可保持或持續一延長期間。因此，本文中所描述之另一實施例係擴增T細胞群之方法，其包含向有需要之對象投予治療有效量之本文所述之T細胞。

**【0249】** 在本文所述之一實施例中，T細胞群在7天之後保持在約50%至約100%之間，在7天之後在約60%至約90%之間，或7天之後在約70%至約80%之間。在本文所述之另一實施例中，T細胞群在7天之後保持在約50%，在7天之後約60%，在7天之後約70%，在7天之後約80%，在7天之後約90%，或在7天之後約100%。

**【0250】** 本文所述之另一實施例係一種治療有需要之對象之癌症的方法，其包含投予有效量，例如治療有效量之包含如本文所述之表現CAR之T細胞之組成物。投予之量及頻率將藉由患者之病況及患者之疾病之類型及嚴重程度等因素來判定，但適當的劑量可藉由臨床試驗判定。

**【0251】** 本文所述之另一實施例係一種治療有需要之對象之肝癌的方法，其包含投予有效量，例如治療有效量之包含如本文所述之表現CAR構築體之T細胞之組成物。投予之量及頻率將藉由患者之病況及患者之疾病之類型及嚴重程度等因素來判定，但適當的劑量可藉由臨床試驗判定。

**【0252】** 在一些實施例中，包含經載體基因修飾之T細胞之組成物係用於治療各種癌症，該載體包含可操作地連接至編碼表現CAR之多核苷酸之啟動子。

**【0253】** 在其他實施例中，提供一種方法，其包含向有需要之患者投予治療有效量的本文所涵蓋之經修飾之T細胞或包含其之組成物，單獨或與一或多種治療劑組合。在某些實施例中，本揭露之細胞用於治療有患癌風險之患者。因此，本揭露提供治療或預防癌症之方法，其包含向有需要之對象投予治療有效量之本揭露之經修飾之T細胞。

【0254】 所屬技術領域中具有通常知識者將認識到，可能需要多次投予本揭露之組成物，以影響所欲療法。舉例而言，組成物可在1週、2週、3週、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、1年、2年、5年、10年、或更久內投予1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、或10次、或更多次。

【0255】 在某些實施例中，可能所欲投予活化T細胞至對象，且隨後再抽血（或進行血球分離術），根據本揭露從其中活化T細胞，且用此等活化及擴增之T細胞輸注患者。此方法可每幾週進行多次。在某些實施例中，T細胞可由抽取10 cc至400 cc之血液中活化。不受理論束縛，使用此多個血液抽吸/多重輸注方案可用以選擇出某些T細胞群。

【0256】 本文所涵蓋之組成物之投予可以任何方便的方式進行，包括藉由氣霧劑吸入、注射、攝取、輸血、植入、或移植。在一些實施例中，組成物係腸胃外投予者。如本文中所使用，詞組「腸胃外投予(parenteral administration/administered parenterally)」係指除腸內及局部投予外之投予模式，通常藉由注射，且包括但不限於血管內、靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、腫瘤內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛膜下、脊椎內及胸骨內注射及輸注。在一個實施例中，本文所涵蓋之組成物藉由直接注射至腫瘤、淋巴結、或感染位點向對象投予。

【0257】 在一個實施例中，向有需要之對象投予有效量之組成物以增加對象對癌症之細胞免疫反應。免疫反應可包括藉由能夠殺死感染細胞、調控T細胞、及輔助T細胞反應之細胞毒性T細胞介導之細胞免疫反應。主要由能夠活化B細胞從而導致抗體產生之輔助T細胞介導之體液免疫反應亦可被誘導。各種

技術可用於分析由本揭露之組成物所誘導之免疫反應的類型，該等技術在所屬技術領域中熟知；例如，在免疫學中之電流協定，由下列編輯：John E.

Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Eth M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley\_& Sons, NY, N.Y.。

【0258】 在T細胞介導之殺滅之情況下，CAR配位體結合引發CAR信號傳導至T細胞，產生誘導T細胞之多種T細胞信號傳導途徑之活化，以產生或釋放能夠藉由各種機制誘導目標細胞凋亡之蛋白質。此等T細胞介導之機制包括（但不限於）將胞內細胞毒性顆粒自T細胞轉移至目標細胞中，促炎性細胞介素之T細胞分泌可直接誘導目標細胞殺滅（或間接經由募集其他殺手效應細胞），且上調T細胞表面上之死亡受體配位體（例如FasL），其在與目標細胞上的同源死亡受體（例如Fas）結合後誘導目標細胞凋亡。

【0259】 在實施例中，本文描述一種治療經診斷患有癌症之對象之方法，其包含將來自捐贈者之T細胞取出，用包含編碼如本文所描述之經工程改造之表現CAR構築體之核酸之載體來基因修飾該等T細胞，從而產生經修飾之T細胞群，且向不同於捐贈者之患者投予經修飾之T細胞群。

【0260】 用於投予本文所描述之細胞組成物之方法包括任何方法，其可有效導致再引入經離體基因修飾之免疫效應細胞，其在對象中直接表現經工程改造之CAR，或再引入免疫效應細胞之經基因修飾之先驅細胞，在引入對象中時分化成表現如本文所描述之經工程改造之表現抗CD19 CAR構築體之成熟免疫效應細胞。

【0261】 儘管前述揭露已藉由說明及實例之方式進行詳細說明以用於清晰理解目的，然而根據本揭露之教示對所屬技術領域中具有通常知識者將顯而

易見可在不背離隨附申請專利範圍之精神或範圍內進行某些變化及修改。僅以說明性的方式而非限制性的方式提供以下實例。所屬技術領域中具有通常知識者將容易地識別許多非臨界參數，其可改變或修改以產生基本上類似的結果。

## 實例

### 實例1

**【0262】** 針對信號傳導域選擇含ITAM域替代CD3 $\zeta$ ，作為具有增強治療潛力之下一代抗CD19嵌合抗原受體(CAR)。使用具有架構抗CD19 scFv、CD28 鉸鏈、CD28跨膜、CD28共刺激(costim)域、及CD3 $\zeta$ 信號傳導域之抗CD19第二代嵌合抗原受體(CAR)作為親本模板，以進行工程改造且合成七個子構築體。此等構築體此後被稱為CD19- $\zeta$ -1xx、CD19- $\epsilon$ 、CD19- $\delta$ 、CD19- $\gamma$ 、CD19-Dap12、-CD19- $\zeta$ -CO（密碼子優化）、及CD19- $\epsilon$ -CO（密碼子優化）。為產生子構築體，親本模板核酸3316至3651之CD3 $\zeta$ 信號傳導域係經以下序列置換：

$\zeta$ 1xx：

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPR  
RKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGDGLFQGLSTATKDTF  
DALHMQALPPR (SEQ ID NO 94)。

$\epsilon$ ：

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLN  
QRRI, (SEQ ID NO 52)

$\delta$  :

GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO 55)。

$\gamma$  :

GQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO 57)。

Dap12 :

YFLGRLVPRGRGAAEAATRQKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK , (SEQ ID NO 59)。

$\zeta$ -CO :

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPR  
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDT  
YDALHMQALPPR (SEQ ID NO 95)。

**【0263】** 將本文所述之CAR構築體選殖至慢病毒載體(LVV)，其包括鼠類幹細胞病毒(mSCV)啟動子，以驅動CAR之組成性表現。

**【0264】** 以下實例中所使用之CAR包括CD8a信號序列，其具有如上所述之架構抗CD19 scFv、CD28鉸鏈、CD28跨膜域、CD28共刺激域、及信號傳導域。

## 實例2

【0265】 CAR-T產物細胞，其自健康人類捐贈者之血球分離材料製造。經收集之血球分離材料係經洗滌，以抗CD8抗體連結之磁珠培養，且使用 CliniMACS®細胞分離系統(Miltenyi Biotech)按製造商之說明書使用抗CD8抗體連結磁珠來加工，以富集CD8+ T細胞，其隨後被冷凍保存。將所得陰性流份洗滌，且如上所描述使用抗CD4抗體連結磁珠來處理，以富集CD4+ T細胞，其隨後被冷凍保存。經分離之CD4+及CD8+初級人類T細胞在OpTmizer CTS™ T細胞擴增基礎培養基中解凍，該培養基補充有2.6% OpTmizer CTS™ T細胞擴增補充品、2.5% CTS免疫細胞血清替代品、1%青黴素/鏈黴素/L-麩醯胺酸、及305個國際單位/mL人類介白素(IL)-2，此後稱為完全OpTmizer™培養基。將T細胞以 $1.5 \times 10^6$ 個細胞/mL之密度再懸浮於含有 $1.66 \mu\text{g/mL}$ 抗CD28抗體（殖株28.2）之OpTmizer培養基中，且接著接種至預塗有 $1.23 \mu\text{g/mL}$ 抗CD3抗體（殖株OKT3）之T-75培養瓶以誘導T細胞活化（第0天）。在活化後第1天，細胞係由編碼親本抗CD19 CAR之LVV轉導，或以20多重性感染(MOI)由子構築體 $\epsilon$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、及Dap12轉導。由 $\zeta\text{CO}$ 及 $\epsilon\text{CO}$ 構築體所組成之額外實驗組以5之MOI轉導，且非轉導(NTD)樣本作為陰性對照。在第3天將T細胞以完全OpTmizer™培養基洗滌，標準化並額外擴增4天（第3天至第7天）。在收集時間點（第7天），細胞係經冷凍保存以供未來使用。在擴增期間（第3天至第7天）之多個時間點，使用Vi-CELL進行細胞計數，且藉由添加完全OpTmizer™培養基將細胞密度標準化至 $0.5$ 至 $1 \times 10^6$ 個細胞/mL。在此等時間點，將平均細胞存活率、直徑、及細胞密度記錄在Vi-CELL上。

【0266】 對於各不同實驗組，細胞數目、細胞存活率、及細胞直徑係自第0至第7天進行追蹤，且總結於表6中。

實驗組	細胞計數( $10^6$ )				存活率(%)				直徑( $\mu$ M)			
	第0天	第3天	第5天	第7天	第0天	第3天	第5天	第7天	第0天	第3天	第5天	第7天
NTD	7.9	8.3	65.6	370.5	96.7	88.6	90.3	93.7	8.6	12.0	12.1	10.8
$\zeta$	7.9	9.9	78.9	336.9	96.7	87.6	91.9	92.5	8.6	11.4	12.1	11.0
$\varepsilon$	7.9	7.4	60.0	213.6	96.7	85.9	88.0	89.2	8.6	11.7	12.1	10.9
$\delta$	7.9	7.6	63.0	301.3	96.7	87.3	90.1	92.1	8.6	11.8	12.1	11.1
$\gamma$	7.9	8.8	69.0	331.8	96.7	87.4	90.3	92.1	8.6	11.7	12.2	10.9
Dap12	7.9	7.51	58.3	325.5	96.7	85.6	89.4	92.8	8.6	12.0	12.1	11.0
$\zeta$ -CO	7.9	8.9	59.3	312.4	96.7	89.2	89.6	91.0	8.6	11.8	12.3	11.1
$\varepsilon$ -CO	7.9	8.0	53.2	229.8	96.7	86.4	85.9	80.8	8.6	11.4	12.5	11.2
$\zeta$ 1xx	7.9	8.6	72.4	348.9	96.7	89.6	92.5	93.1	8.62	11.7	12.1	10.9

【0267】 第0天每實驗組總共刺激 $7.9 \times 10^6$ 個細胞。在七天製造程序結束時， $\varepsilon$ 、 $\varepsilon$ CO、及CD19-RVV構築體擴增至少略高於 $200 \times 10^6$ 個總細胞。產物細胞之直徑係用作T細胞活化之間接量度，且在製造期間任何群組之間並未顯示顯著差異。

### 實例3

【0268】 在第6天及第7天藉由流動式細胞測量術測量CAR表現，以判定CAR-T產物細胞之轉導效率。T細胞用針對CD3、CD4、CD8之螢光團接合抗體、及惠特洛(Whitlow)連接子(CAR)染色，且藉由流動式細胞測量術表徵，以判定轉導效率及CD4+/CD8+ T細胞比率。CAR表現（抗CD19 CAR）之評估係

藉由針對在抗CD 19 scFvs中存在之惠特洛連接子的螢光團接合抗體來實現。亦使用可固定細胞存活率染料以允許活細胞之特定分析。藉由與適當抗體混合在4°C下培養20分鐘來染色細胞，隨後用染色緩衝液進行2次洗滌，且隨後藉由在室溫下於0.6%多聚甲醛（於磷酸緩衝鹽水或漢克平衡鹽溶液中）中培養10分鐘來固定。在FACSCanto™儀器上收集所有流動式細胞測量術資料，並使用FlowJo軟體分析資料。

【0269】 使用惠特洛連接子染色及後續流動式細胞測量術分析在製造第6天及第7天皆測量CAR表現（表7）。在第6天實驗組顯示相當的CAR表現（81.5%至91.9%），且在第7天保持相對穩定。唯一例外係ε構築體，其在第6天具有最低的CAR表現（為74.2%），且在第7天亦顯著降低至58.4%。

實驗組	轉導%			
	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 7 天
NTD	N/A	N/A	N/A	N/A
ζ	N/A	N/A	81.5	83.9
ε	N/A	N/A	74.2	58.4
δ	N/A	N/A	91.8	90.4
γ	N/A	N/A	91.9	89.9
Dap12	N/A	N/A	91.7	91.3
ζ-CO	N/A	N/A	89.1	94.3
ε-CO	N/A	N/A	90.3	95.1
ζ1xx	N/A	N/A	88.2	87.9

#### 實例4

**【0270】** T細胞介導之細胞毒性係依據以下來測量：相較於單獨接種目標細胞所發射之信號，共培養孔中目標螢光素酶信號之降低。在收集日（製造第7天）冷凍保存自衍生自健康捐贈者血球之T細胞所製造之T細胞產物。在共培養之第0天，在與目標細胞開始共培養之前，T細胞產物在完全OpTmizer™培養基中解凍並靜置隔夜。在開始共培養之前，將各T細胞樣本之等分試樣與針對CD3、CD4、CD8之抗體-螢光團、及惠特洛連接子(CAR)一起培養，且藉由流動式細胞測量術分析以評估轉導效率。使用客製抗體評估總轉導效率，該客製抗體結合單鏈可變片段(scFv)之重鏈及輕鏈之間的惠特洛連接子。用CellTrace™ Violet (CTV)試劑標記T細胞，且隨後用R-10%培養基[RPMI-1640培養基，補充有10%胎牛血清、青黴素鏈黴素、L-麩醯胺酸、及HEPES]洗滌。將CTV標記之樣本之部分固定，且儲存在4°C下直至第4天，當樣本藉由流動式細胞測量術與第4天之共培養樣本同時分析，以評估CTV信號之初始水平（CTV最大值）。在R-10%培養基中（共培養第0天），將T細胞產物及表現螢光素酶之目標細胞以不同的反應物對目標(E:T)比（在3:1至1:243之範圍中）接種在一起。將T細胞產物連續稀釋3倍，而每孔之目標細胞數目保持恆定於20,000個細胞。陽性目標細胞包括Nalm6 (CD19+)及ST486 (CD19+)。作為對照，在不存在任何目標細胞（亦即，單獨之T細胞）下培養T細胞產物，以評估在不存在抗原刺激下T細胞功能之基礎水平。在37°C下培養共培養物1或4天，且如下文所述般進行功能評估。

**【0271】** 在解凍及隔夜靜置之後，以CD3、CD4、CD8、及惠特洛連接子(CAR)染色各實驗組之樣本，以評估其回復百分比、及CAR表現。接著藉由添加NTD細胞將組別標準化至最低轉導百分比(43.7%)。完成此以確保所有樣本

在下游檢定中具有相同數目之CAR+樣本。產物細胞成功地標準化，且範圍為41.0至46.8%（表8）。觀測到ε構築體在細胞表面上下調CAR，且在與目標細胞共培養起始的時候降低至27.7% CAR+。

表 8：共培養裝置第 0 天之 CAR-T 產物細胞之 CAR 表現

實驗組	轉導%	
	標準化前/隔夜靜置	標準化後
NTD	N/A	N/A
ζ	83.4	41.9
ε	43.7	27.7
δ	86.4	42.1
γ	85.7	41.0
Dap12	88.1	43.1
ζ-CO	93.7	42.5
ε-CO	94.1	43.6
ζ1xx	87.1	43.8

【0272】 T細胞介導之細胞毒性係依據以下來測量：相較於單獨接種目標細胞所發射之信號，共培養孔中目標螢光素酶信號之降低。共培養起始後第1天及第4天，以0.14 mg/mL之最終濃度將D-螢光素受質添加至共培養孔中，且培養盤於37°C下在暗處培養10分鐘。之後立即在VarioSkan™ LUX或VarioSkan® Flash多模微量盤讀取儀中讀取螢光信號。T細胞介導之細胞毒性係計算如下：

$$\text{細胞毒性}\% = [1 - (\text{關注樣本}/\text{單獨目標對照}) \text{之螢光素酶信號}] * 100$$

【0273】 第1天（表9）及第4天（表10）讀數顯示跨所有兩種抗原表現細胞系（Nalm6及ST486）之等效劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	17.1	5.2	-0.1	7.8	-0.1	0.1	-5.3
	18.5	0.4	-0.3	12.5	-1.8	1.3	-1.5
	11.5	8.9	4.0	5.0	6.3	3.6	-3.1
ζ	92.4	64.3	27.1	19.1	-0.6	-6.6	-7.6
	92.8	64.8	29.6	22.5	-4.4	0.0	-0.1
	91.5	59.2	33.4	15.8	20.1	2.1	0.1
ε	90.5	59.6	27.6	18.5	1.2	-0.5	-3.6
	91.7	59.4	21.0	17.0	1.9	-2.1	-6.0
	90.7	62.5	37.0	14.9	20.2	15.9	14.8
δ	78.4	45.1	25.1	17.4	0.0	2.5	0.9
	79.1	42.4	21.2	16.7	1.0	0.2	-3.4
	75.5	47.6	24.8	10	20	16.3	13.4
γ	73.4	44.3	23.2	14.9	2.1	1.6	-3.8
	74.7	40.5	16.3	17.9	0.8	0.7	0.0
	70.1	40.0	24.0	12.6	6.7	3.0	4.2
Dap12	83.2	51.6	29.2	21.5	5.8	-1.0	-3.9
	82.3	46.2	22.2	20.1	3.0	1.2	0.7
	81.2	48.3	22.6	12.0	13.8	3.3	2.6
ζ-CO	94.5	74.2	41.8	25.7	3.9	3.7	-1.8
	96.4	68.3	34.6	23.5	5.9	3.4	-1.1
	93.4	70.0	34.4	21.0	3.1	0.4	1.5
ε-CO	89.3	54.5	24.3	21.9	4.6	6.1	-0.6
	86.1	50.3	23.5	20.4	3.7	0.1	2.6
	88.8	46.3	26.8	13.8	5.5	5.3	0.0
ζ1xx	88.9	59.2	27.0	18.4	-0.8	-1.1	-1.8

	87.6	56.0	21.3	17.9	-2.4	-2.7	-0.2
	85.2	55.7	37.7	15.0	14.4	20.3	19.0

表 10

第 4 天功能性表徵資料：三重複中 Nalm6 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	60.3	20.4	7.1	-1.8	-1.3	-6.8	0.6
	57.8	20.9	4.9	-2.5	-4.2	-4.1	-0.9
	64.9	16.6	-2.7	-3.2	-2.3	-5.6	-0.2
$\zeta$	100.1	100.1	97.2	77.9	43.6	21.3	6.9
	100.1	99.9	95.7	73.3	37.3	18.1	8.8
	100.1	100.1	98.2	79.8	37.2	16.1	6.2
$\varepsilon$	100.1	100.1	98.2	59.3	11.4	-1.6	-6.3
	100.1	100.1	96.5	46.1	13.9	-0.9	1.6
	100.1	100.1	98.2	58.1	13.4	-1.7	-3.3
$\delta$	100.1	100.1	98.0	64.0	30.6	4.0	-2.3
	100.1	100.1	96.4	62.5	25.1	7.3	5.5
	100.1	100.1	97.5	64.9	27.8	6.9	2.4
$\gamma$	100.1	100.1	96.2	61.4	25.9	4.6	-1.0
	100.1	100.0	94.0	60.4	20.6	6.1	0.1
	100.1	100.1	96.4	62.7	23.0	3.3	-1.4
Dap12	100.1	100.1	98.1	73.8	33.7	4.2	-1.0
	100.1	100.1	96.7	68.6	26.8	4.0	3.5
	100.1	100.1	98.9	73.1	28.6	-1.8	-0.3
$\zeta$ -CO	100.1	100.1	99.9	85.0	42.5	9.5	1.8
	100.1	100.1	99.4	81.3	40.6	14.7	2.6
	100.1	100.1	99.5	84.9	46.3	11.8	-0.1
$\varepsilon$ -CO	100.1	100.0	97.5	61.2	27.0	5.1	-1.8
	100.1	99.9	96.4	58.2	26.9	6.4	-2.6
	100.0	100.0	96.9	62.4	27.0	0.3	0.1
$\zeta$ 1xx	100.1	100.1	97.5	68.6	36.8	6.8	5.2
	100.1	100.1	94.3	63.7	23.3	13.3	5.3
	100.1	100.1	97.8	67.2	34.5	10.0	5.2

## 實例5

【0274】 在如前述實例中所描述，在共培養起始後的第1天，收集上清液並根據製造商之指示使用Meso Scale Discovery V-PLEX®促炎性板1人類套組來分析細胞介素水平。具體而言，來自T細胞產物之共培養物之上清液（以1:1的E:T比接種，具有表現抗原Nalm6及ST486）係針對干擾素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IL-2、及腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )由抗原接合所介導之分泌的水平進行分析。同時分析來自不存在目標細胞（單獨之T細胞）下培養之T細胞之上清液，以評估不存在抗原下細胞介素產生之基礎水平。將所有樣本稀釋至偵測範圍內。

【0275】 自1:1之E:T比收集上清液，並經由MSD針對IFN- $\gamma$ 、IL-2、及TNF- $\alpha$ 分泌進行分析。分析顯示，當與抗原表現細胞系Nalm6及ST486共培養時，所有構築體都分泌細胞介素（表11）。相比於 $\zeta$ 及 $\zeta$ -CO基準對照， $\zeta$ 1xx、 $\epsilon$ -CO、及一定程度的 $\delta$ 都分泌相當高水平的促炎性細胞介素。相比於 $\zeta$ 及 $\zeta$ -CO基準對照， $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、及Dap12產生較低水平的細胞介素。當與ST486細胞系之共培養物分泌之水平相比，與Nalm6細胞系之共培養物引出更高水平的細胞介素，然而，構築體之總階層式模式(overall hierarchical pattern)在兩種細胞系中一致。另一方面，NTD對照組當單獨培養或與抗原表現細胞系培養時並未分泌任何可量測或顯著水平之細胞介素。

表 11

第 1 天功能性表徵資料：Nalm6 及 ST486 細胞系中之 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 之經由 MSD 之細胞介素分析

--	--	--	--	--	--	--	--

實驗組	細胞介素	Nalm6	% CV	ST486	% CV	單獨之 T 細胞	% CV
NTD	IFN- $\gamma$	720.2	28.8	1289.0	24.1	16.9	0.0
	TNF- $\alpha$	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	IL-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$\zeta$	IFN- $\gamma$	96335.4	20.9	27645.8	15.0	200.9	0.0
	TNF- $\alpha$	1394.4	12.0	424.3	15.6	0.0	0.0
	IL-2	1857.6	10.8	275.0	27.0	0.0	0.0
$\varepsilon$	IFN- $\gamma$	40251.9	28.0	14887.6	11.6	126.8	0.0
	TNF- $\alpha$	495.8	14.0	226.2	10.8	0.0	0.0
	IL-2	217.6	1.5	62.4	23.8	0.0	0.0
$\delta$	IFN- $\gamma$	58829.3	20.0	16827.2	5.3	60.8	0.0
	TNF- $\alpha$	1071.2	7.7	338.2	9.9	0.0	0.0
	IL-2	1189.5	5.2	148.0	15.3	0.0	0.0
$\gamma$	IFN- $\gamma$	37352.4	19.5	8944.0	3.9	47.3	0.0
	TNF- $\alpha$	582.5	3.6	136.9	7.0	0.0	0.0
	IL-2	418.6	7.9	29.1	26.2	0.0	0.0
Dap12	IFN- $\gamma$	44462.9	20.6	12763.5	7.9	67.3	0.0
	TNF- $\alpha$	625.8	3.5	171.9	10.7	0.0	0.0
	IL-2	467.8	9.0	47.7	48.1	0.0	0.0
$\zeta$ -CO	IFN- $\gamma$	101222.2	20.4	31320.8	4.0	67.3	0.0
	TNF- $\alpha$	1310.0	5.7	442.6	2.1	0.0	0.0
	IL-2	1559.1	3.7	247.9	18.0	0.0	0.0
$\varepsilon$ -CO	IFN- $\gamma$	81122.0	20.3	27685.4	3.3	148.8	0.0
	TNF- $\alpha$	857.5	9.8	374.9	3.6	0.0	0.0
	IL-2	1180.8	11.1	257.8	7.2	0.0	0.0
$\zeta$ 1xx	IFN- $\gamma$	80623.9	26.4	22041.0	5.4	175.2	0.0
	TNF- $\alpha$	1126.6	11.4	352.4	3.6	0.0	0.0
	IL-2	1493.0	15.3	227.7	12.3	0.0	0.0

### 實例6

【0276】 在共培養起始後第4天，收集以1:1之E:T比與目標細胞接種之T細胞產物，以抗體-螢光團板染色以識別T細胞，且藉由流動式細胞測量術分

析。T細胞產物之增殖能力係藉由流動式細胞測量術分析以下來判定：將CTV染料之細胞分裂驅動稀釋對抗原表現目標細胞的反應，相較於對已經單獨培養之T細胞產物（單獨之T細胞）的反應，該單獨之T細胞係用以評估在不存在刺激下穩態增殖之基礎水平。藉由流動式細胞測量術同時分析在共培養設置（CTV最大值）當天固定之CTV標記T細胞，以評估在細胞增殖之前初始CTV信號之強度。

【0277】 使用稀釋之Cell Trace Violet (CTV)標記，以評估增殖。隨著產物CAR-T細胞分裂，每次分裂都會稀釋染料，且因此相比於第0天之細胞，較低的CTV MFI係表示增殖。當單獨培養或與抗原表現細胞系培養時，在NTD對照組中見到最小的恆定性或非抗原依賴性增殖。當針對ST486細胞系培養時，所有其他構築體顯示相當的MFI水平。當與Nalm6細胞系培養時， $\zeta$ -CO及 $\epsilon$ 兩者皆具有最低的CTV MFI，其表示更大的增殖。所有其他構築體相對於此相同目標系具有相當的增殖水平。完整總結見表12。

實驗組	Nalm6	ST486	單獨之 T 細胞
NTD	19120	15672	19256
$\zeta$	5762	4997	17367
$\epsilon$	4193	5257	11481
$\delta$	5874	6186	16613
$\gamma$	6418	7869	20137
Dap12	5725	7365	17696
$\zeta$ -CO	3441	4211	15277
$\epsilon$ -CO	5812	5103	21260
$\zeta$ 1xx	5427	5359	18286

## 實例7

【0278】 對於體內研究，在注射前一天，抗CD19產物CAR T細胞係如上文所描述般製備，從冷凍系統中取出，在37°C水浴中解凍，且再懸浮於預熱之完全OpTmizer™培養基。將細胞懸浮液之等分試樣於台酚藍中稀釋，且手動計算細胞。將細胞懸浮液在400 ×g下在室溫下離心5分鐘，且吸取上清液。接著將細胞以2.0至5.0 × 10<sup>6</sup>個細胞/mL再懸浮於完全OpTmizer™培養基中，且在37°C/5% CO<sub>2</sub>培養箱中培養隔夜。在注射當天，將NTD T細胞與CAR+ T細胞以按細胞總數之標準化測試組指定之比率彙集。將均質細胞懸浮液之等分試樣於台酚藍溶液中稀釋，且使用血球計手動計算細胞，以判定細胞之注射前存活率。隨後將細胞懸浮液以200 × g在4°C下離心10分鐘。抽吸各小瓶之上清液，且在室溫下將細胞團塊再懸浮於DPBS中。測試兩種CAR T細胞劑量：每組5.0 × 10<sup>5</sup>及2.0 × 10<sup>6</sup> CAR+細胞。在植入之後，將來自各懸浮液之剩餘細胞之等分試樣用台酚藍溶液稀釋，且計算以判定植入後細胞存活率。

【0279】 將相同總數之T細胞（2.4 × 10<sup>6</sup>個細胞）投予至在各治療組中之小鼠。將投予至各治療組之劑量經標準化，以基於抗CD19 CAR轉導效率對各組遞送相同總數之T細胞。

【0280】 使用IVIS 5光學影像系統進行體內BLI。動物在大約1%至2%之異氟烷氣體麻醉下照相。將各小鼠IP注射0.2 mL/20 g D-螢光素，並在注射之後10分鐘以俯臥位接著仰臥位照相。使用電荷耦合元件(CCD)晶片之大的像素合併(binning)，並調整曝光時間，以自影像中各小鼠中可觀察到的轉移性腫瘤獲得至少數百個計數並避免CCD晶片之飽和。在第6、13、20、27、34、41、及

48天收集BLI影像。使用Living Image軟體版本4.7.1分析影像。將全身固定體積關注區域(regions of interest, ROI)置於各個別動物之俯臥及仰臥位影像上並基於動物識別進行標示。針對所有ROI計算總通量（光子/秒）並匯出，其中客製的書面標籤針對各小鼠發現的各種信號列表，以促進組之間的分析。將所關注之俯臥及仰臥區域一起加總，以估計全身腫瘤負荷。

【0281】 各實驗組之BLI總結於表13中。接受媒劑對照或NTD細胞之組別顯示無腫瘤控制，且兩組在第20天皆由於高腫瘤負荷而安樂死。所有高劑量構築體在第13天均顯示顯著且相當的功效。早在第20天，高劑量組開始喪失對腫瘤的控制。高劑量組之 $\epsilon$ -CO、Dap12、及 $\zeta$ 1XX維持腫瘤控制直至第48天研究終止。

【0282】 低劑量組中之腫瘤控制從研究開始就更具變化。 $\zeta$ 1xx在早期具有最佳腫瘤控制，且在整個研究中維持其功效。 $\epsilon$ -CO在前三個讀數展現最小腫瘤控制，但隨後在第27天對所有小鼠中顯示突然且完全的腫瘤控制，且在整個研究之其餘部分中維持此腫瘤控制。 $\epsilon$ 在第34天對五隻小鼠中的三隻顯示類似的晚期腫瘤控制，其延續至研究結束。由於高腫瘤負荷，其餘兩者最終安樂死。儘管更具變化，但Dap12在低劑量研究中顯示出與在高劑量研究中相似的腫瘤控制功效。在第27天開始，一隻小鼠似乎特別失去了對腫瘤的控制，但在第48天重獲控制。

	第 6 天	第 13 天	第 20 天	第 27 天	第 34 天	第 41 天	第 48 天
	5.70E+07	2.14E+10	1.56E+11				

媒劑	4.96E+07	2.07E+10	1.28E+11				
	5.62E+07	2.26E+10	1.02E+11				
	4.25E+07	2.03E+10	1.34E+11				
	2.61E+07	1.62E+10	9.01E+10				
NTD	5.62E+07	2.19E+10	1.50E+11				
	2.62E+07	1.19E+10	9.40E+10				
	4.92E+07	1.97E+10	1.11E+11				
	4.18E+07	1.78E+10	9.67E+10				
	5.74E+07	1.60E+10	1.27E+11				
$\epsilon(5E5)$	3.17E+07	9.08E+06	1.86E+07	1.22E+06	6.94E+05	8.57E+05	8.93E+05
	5.46E+07	1.55E+07	2.81E+08	2.45E+09	8.25E+05	8.94E+05	1.02E+06
	5.94E+07	2.57E+07	8.71E+07	2.56E+09	1.24E+11		
	3.93E+07	5.34E+07	1.30E+09	9.95E+08	1.06E+07	2.70E+07	4.23E+06
	4.42E+07	4.66E+07	5.03E+08	3.32E+09	3.98E+10	9.85E+10	
$\delta(2E6)$	5.97E+07	7.89E+05	8.52E+05	7.74E+05	7.64E+05	9.26E+05	2.22E+06
	5.43E+07	8.14E+05	8.03E+05	7.48E+05	7.16E+05	5.97E+05	9.86E+05
	3.73E+07	8.93E+05	7.57E+05	7.99E+05	7.37E+06	1.88E+08	7.91E+09
	3.49E+07	8.59E+05	9.92E+05	8.21E+05	1.01E+06	1.15E+06	1.14E+06
	4.44E+07	8.84E+05	1.46E+06	1.30E+06	5.17E+06	2.13E+07	1.51E+08
$\delta(5E5)$	6.25E+07	1.58E+06	1.53E+06	1.55E+06	9.61E+05	7.58E+05	7.34E+05
	5.37E+07	3.33E+07	3.85E+06	5.04E+06	1.58E+08	4.31E+09	2.37E+10
	4.84E+07	1.63E+07	1.19E+08	5.33E+06	1.60E+06	1.43E+07	5.58E+08
	2.96E+07	2.02E+06	9.34E+07	1.85E+09	7.08E+09	1.12E+10	4.70E+10
	3.85E+07	5.34E+06	3.09E+06	2.65E+07	6.85E+09	8.03E+08	1.20E+07
$\gamma(2E6)$	3.85E+07	9.60E+05	7.93E+05	7.37E+05	8.41E+06	1.77E+08	1.11E+10
	6.26E+07	1.04E+06	9.63E+05	7.41E+05	9.52E+05	2.64E+06	7.53E+07
	4.55E+07	8.43E+05	7.65E+05	5.96E+05	1.65E+06	8.39E+05	7.27E+05
	2.97E+07	9.05E+05	7.96E+05	7.40E+05	3.62E+06	1.32E+08	9.97E+09
	5.31E+07	6.22E+05	1.06E+06	7.53E+05	1.14E+06	1.24E+08	6.14E+09
$\gamma(5E5)$	3.09E+07	5.77E+06	1.71E+07	6.61E+08	1.44E+10	2.43E+10	5.18E+09
	5.28E+07	3.46E+07	1.24E+07	1.55E+08	1.39E+09	2.44E+06	1.38E+06
	6.27E+07	3.04E+07	2.11E+07	8.96E+07	9.76E+07	3.92E+08	2.85E+09
	3.76E+07	2.60E+07	2.10E+08	1.46E+08	8.88E+09	5.52E+10	
	4.60E+07	3.49E+06	4.15E+06	3.32E+07	8.46E+07	3.57E+09	1.62E+10
Dap12	4.67E+07	1.01E+06	9.08E+05	7.37E+05	1.03E+06	1.92E+06	1.05E+06

(2E6)	3.10E+07	8.80E+05	7.88E+05	7.33E+05	9.11E+05	1.55E+06	7.12E+05
	6.33E+07	9.11E+05	1.23E+06	7.46E+05	7.70E+05	1.67E+06	8.30E+05
	3.70E+07	9.45E+05	8.30E+05	8.39E+05	8.82E+05	1.72E+06	9.20E+05
	5.24E+07	8.75E+05	1.06E+06	8.59E+05	1.13E+06	2.13E+06	8.41E+05
Dap12 (5E5)	3.69E+07	9.94E+05	9.22E+05	7.98E+05	7.52E+05	1.70E+06	9.51E+05
	6.37E+07	3.56E+06	3.15E+06	1.42E+07	1.12E+06	1.68E+06	9.18E+05
	3.12E+07	5.41E+06	3.69E+06	2.80E+08	2.84E+09	1.29E+08	9.88E+05
	5.20E+07	1.23E+06	8.99E+05	7.79E+05	1.09E+07	1.47E+06	5.84E+05
	4.67E+07	1.14E+06	8.74E+05	6.81E+05	7.76E+05	1.54E+06	8.81E+05
$\zeta$ -CO (2E6)	3.62E+07	1.14E+06	1.84E+06	9.89E+06	7.24E+07	5.05E+08	1.01E+06
	2.72E+07	9.86E+05	2.26E+06	5.22E+07	1.10E+10	4.26E+08	3.53E+07
	7.18E+07	2.18E+06	7.91E+05	8.01E+05	1.70E+06	8.12E+07	2.05E+09
	5.10E+07	1.05E+06	1.08E+06	1.21E+06	9.76E+05	1.09E+06	7.52E+05
	4.83E+07	1.43E+06	2.80E+06	5.00E+07	2.36E+08	2.07E+06	1.15E+06
$\zeta$ -CO (5E5)	7.24E+07	2.10E+07	1.19E+07	5.65E+08	2.75E+10	1.19E+08	6.57E+07
	2.67E+07	1.21E+06	8.73E+06	4.56E+08	4.22E+08	1.60E+06	9.52E+05
	3.61E+07	9.48E+06	2.05E+07	8.72E+08	4.24E+09	2.46E+07	5.10E+06
	5.06E+07	5.67E+06	1.38E+07	3.41E+08	2.27E+09	1.15E+09	6.31E+08
	4.11E+07	2.95E+07	2.91E+07	1.60E+09	2.27E+10	9.11E+10	2.80E+10
$\varepsilon$ -CO (2E6)	4.25E+07	1.20E+06	6.99E+05	8.92E+05	9.26E+05	1.09E+06	1.08E+06
	3.57E+07	9.05E+05	7.41E+05	7.97E+05	8.20E+05	1.02E+06	9.12E+05
	5.01E+07	1.11E+06	7.32E+05	8.47E+05	8.07E+05	9.47E+05	1.12E+06
	7.34E+07	8.06E+05	7.28E+05	8.15E+05	8.70E+05	8.80E+05	8.66E+05
	2.90E+07	1.01E+06	7.35E+05	8.70E+05	9.52E+05	1.07E+06	1.02E+06
$\varepsilon$ -CO (5E5)	3.50E+07	7.97E+08	1.47E+09	1.06E+06	1.18E+06	1.25E+06	1.26E+06
	4.25E+07	3.23E+08	1.47E+09	8.90E+05	9.61E+05	1.10E+06	6.87E+05
	4.92E+07	3.94E+08	4.44E+08	9.13E+05	8.40E+05	1.16E+06	9.43E+05
	2.81E+07	7.75E+07	6.65E+08	8.45E+05	9.78E+05	1.11E+06	1.03E+06
	7.74E+07	1.36E+08	3.30E+08	9.72E+05	9.65E+05	1.27E+06	1.08E+06
$\zeta$ 1xx (2E6)	5.53E+07	8.26E+05	7.03E+05	6.64E+05	7.29E+05	8.34E+05	8.46E+05
	5.85E+07	7.04E+05	7.94E+05	6.84E+05	7.38E+05	8.70E+05	8.28E+05
	4.05E+07	8.02E+05	8.53E+05	6.34E+05	7.94E+05	7.76E+05	7.06E+05
	4.83E+07	7.98E+05	7.91E+05	7.33E+05	8.15E+05	8.45E+05	9.63E+05
	2.74E+07	8.59E+05	8.38E+05	1.13E+06	8.34E+05	8.70E+05	9.61E+05
	5.90E+07	1.57E+06	1.20E+06	2.26E+07	9.42E+05	9.44E+05	9.98E+05

$\zeta 1_{xx}$ (5E5)	3.50E+07	2.29E+06	9.56E+05	7.49E+05	8.15E+05	1.08E+06	9.61E+05
	4.41E+07	9.23E+06	2.07E+07	1.77E+07	9.04E+05	9.48E+05	1.03E+06
	3.94E+07	3.50E+06	3.27E+06	1.33E+06	8.11E+05	9.81E+05	7.68E+05
	5.51E+07	5.59E+06	1.45E+06	2.05E+06	7.72E+05	9.54E+05	9.32E+05

## 實例8

【0283】 對於離體ddPCR分析，每週經由眼窩靜脈竇收集100  $\mu$ l之血液體積，並儲存在冰上。在T細胞注射後24小時開始對動物取樣，並在研究期間之第8天、第15天、第22天、第29天、第36天、及第43天持續每週取樣。按製造商之指示使用KingFisher™ Flex（小體積）進行DNA純化，接著經由內部Kite程序、及Bio-Rad儀器在純化DNA上執行ddPCR。

【0284】 為了評估體內CAR T細胞擴增及持久性，經由ddPCR針對每ug之DNA之CAR複本分析周邊血液（表14）。分析僅限於顯示改善腫瘤控制之構築體（ $\zeta 1_{xx}$ 、Dap12、及 $\epsilon$ -CO）。正如我們在Nalm6腫瘤模型中的標準抗CD19 CAR所預期的那樣，小鼠之周邊血液中 $\zeta$ 展現出很少的或幾乎沒有擴增。然而， $\epsilon$ -CO及更小程度的 $\zeta 1_{xx}$ 、及Dap12在兩種治療劑量中，於小鼠之周邊血液中具有增加之CAR T細胞峰值擴增及持久性。

**表 14**  
**CAR 複本 (每 ug 之 DNA)**

	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天
媒介劑	0.00E+00	3.88E-03	0.00E+00			
	7.91E-03	0.00E+00	0.00E+00			
	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			
	4.56E-03	1.85E-03	0.00E+00			
	6.94E-03	2.61E-03	0.00E+00			
NTD	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			

	0.00E+00	5.36E-03	3.10E-03			
	4.22E-03	0.00E+00	0.00E+00			
	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			
	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			
	7.27E-02	3.03E-01	1.13E-01	9.41E-02	8.81E-01	2.62E+00
		1.06E-01	4.53E-03	1.36E-01	9.35E-01	1.50E+00
$\zeta$ (2E6)	1.20E-01	5.31E-01	5.82E-03	2.56E-02	2.70E-02	1.25E+00
	3.53E-01	1.44E-01	8.30E-03	1.91E-02	2.65E-02	1.79E-01
	3.36E-01	8.36E-01	6.26E-02	8.51E-03	3.00E-02	2.68E-01
	5.79E-01	5.09E-02	7.91E-03	8.67E-02	3.89E-01	4.29E-02
	1.25E-01	3.33E-01	1.80E-02	5.71E-02	2.06E-02	7.68E-01
$\zeta$ (5E5)	2.22E-02	2.02E-01	5.50E-03	1.34E-02	2.67E+00	2.18E+00
	1.67E-01	1.66E-01	1.11E-01	5.04E-02	3.10E-01	6.50E-01
	1.64E-01	5.94E-02	0.00E+00	1.34E-01	1.51E-01	1.07E-01
	7.27E-02	3.03E-01	1.13E-01	9.41E-02	8.81E-01	2.62E+00
		1.06E-01	4.53E-03	1.36E-01	9.35E-01	1.50E+00
Dap12 (2E6)	2.52E-01	2.52E+00	2.33E-01	1.65E-01	2.35E-02	1.87E-01
	8.40E-02	2.31E+00	3.45E-01	5.22E-01	7.69E-01	1.73E+00
	1.48E-01	2.76E+00	1.45E-01	2.82E-01	1.99E-01	1.75E-01
	7.20E-02	1.04E+00	5.66E-01	1.81E+00	1.55E+00	2.09E+00
	2.52E-01	1.23E+00	2.76E-01	9.82E-03	9.13E-02	3.39E+00
Dap12 (5E5)	6.40E-02	4.32E-01	1.24E+00	3.98E-01	2.23E+00	2.08E+00
	4.36E-01	3.65E-01	1.08E-01	3.20E-01	1.39E+01	2.60E+00
	9.60E-02	1.32E-01	9.15E-02	4.36E-01	6.12E+00	5.05E+01
	1.92E-01	4.69E-01	1.36E+00	3.23E-01	7.11E+00	0.00E+00
	7.60E-02	6.14E-01	5.73E-01	3.79E+01	8.67E+00	7.62E+00
$\varepsilon$ -CO (2E6)	3.76E-01	8.87E+00	2.57E+01	1.44E+02	6.06E+01	2.12E+02
	8.40E-02	2.46E+00	2.63E+00	1.53E+02	2.42E+02	1.40E+02
	3.08E-01	1.96E+00	3.01E+00	1.56E+02	1.34E+02	5.83E+01
	1.56E-01	3.59E+00	8.98E-01	8.78E+01	4.13E+02	2.44E+02
	2.12E-01	1.85E+00	5.95E+00	2.27E+02	4.65E+02	3.61E+02
$\varepsilon$ -CO (5E5)	6.80E-02	1.72E-01	2.57E+00	2.20E+01	1.26E+02	4.90E+02
	2.84E-01	2.36E-01	4.77E-01	5.42E+01	1.42E+02	3.61E+02
	1.84E-01		1.71E+01	3.13E+02	1.22E+02	1.69E+02
	3.20E-01		1.73E+00	9.09E+01	5.20E+01	6.21E+01

	8.00E-02	2.32E-01	1.92E+00	1.29E+02	4.08E+01	8.49E+01
$\zeta_{1xx}$ (2E6)	1.96E-01	9.51E+00	5.64E-01	9.47E+00	2.08E+01	5.62E+01
	1.24E-01	6.42E+00	8.06E-01	2.28E+00	6.61E+00	1.87E+01
	8.00E-02	5.61E+00	7.52E-01	1.95E+00	5.59E-01	1.35E+00
	1.60E-01	3.79E-01	2.17E-01	7.47E-01	1.46E+00	2.39E+00
	5.08E-01	4.49E+00	5.98E-01	1.50E-01	1.11E+00	4.21E-01
$\zeta_{1xx}$ (5E5)	4.80E-02	1.08E+00	8.70E-01	4.41E+00	1.65E+01	6.01E+01
	1.48E-01	2.90E-01	1.13E+00	1.31E+01	3.47E+01	3.23E+01
	1.08E-01	2.01E-01	5.33E-03	1.18E+01	2.45E+00	2.74E+00
	3.32E-01	1.17E-01	1.44E+00	1.58E+01	3.59E+00	1.77E+00
	1.04E-01	1.58E-01	2.39E-01	4.21E+00	1.19E+01	6.39E+00

## 實例9

【0285】 下列實例描述三種新的第二代CD19/CD20雙順反子CAR構築體，其利用三種新穎之CD19\_CD3  $\epsilon$ -CO突變域中之一者，作為抗CD19對照CAR基準中CD3  $\zeta$ 之置換。在具有CD20 CAR之雙順反子構築體中，相對於野生型CD3  $\epsilon$ -CO，三種CD3  $\epsilon$ 突變體對膜展現出改善之CD19 CAR表現。所有皆成功轉導且在初級人類T細胞中表現。此等新的CAR構築體透過體外檢定表徵。

【0286】 構築體設計。抗CD19 CD3  $\zeta$ 第二代嵌合抗原受體(CAR)，以下稱為 CD19z，用以產生具有序列

```
ATGGCACTTCCAGTCACCGCACTCTTGCTTCCACTGGCCTTGTTGCTGCAT
GCTGCGCGGCCAGATATACAGATGACCCAAACGACGTCTAGCCTCAGTGC
GTCACTCGGGGATCGGGTGACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTT
CAAAATATCTTAACTGGTATCAACAAAAGCCAGATGGAACCGTAAAACT
GTCATATAACCACACCAGTCGCCTGCATTCAGGGGTTCCGAGCCGCTTTTC
TGGGAGCGGTAGCGGAACtGAtTATAGCTTGACAATAAGCAACCTCGAGC
```

AGGAAGACATTGCGACGTACTTCTGTCAGCAAGGGAACACGCTGCCGTAT  
ACCTTCGGTGGCGGCACTAAACTGGAAATCACGGGATCTACGTCTGGATC  
CGGAAAACCTGGATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAGTCAAGTTG  
CAAGAGTCTGGACCTGGTCTCGTGGCACCTTCACAGTCACTCTCCGTTACC  
TGTACCGTATCTGGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGTGTTCATGGATACGC  
CAACCACCGCGAAAAGGTCTTGAATGGCTGGGGCGTTATCTGGGGATCCGA  
AACCACATACTACAACCTCTGCGCTCAAGTCACGGCTGACTATTATAAAGG  
ACAATTCAAAGAGCCAAGTGTTCTGAAAATGAACAGCCTGCAGACTGAT  
GACACTGCAATATATTACTGCGCCAAGCATTACTATTACGGCGGATCTTA  
CGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTAACAGTCAGCTCCGCGG  
CCGCATTGGACAATGAAAAATCCAATGGCACAATAATTCATGTAAAGGG  
CAAACACTTGTGTCCTAGCCCACTCTTTCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTG  
GGTGCTCGTTGTGGTTGGAGGCGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGTTGGTGAC  
TGTAGCCTTTATAATATTCTGGGTTAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTAC  
ATTCAGACTATATGAACATGACACCAAGACGCCCCGGCCCCACAAGAAA  
ACACTATCAGCCCTATGCTCCGCCTCGGGACTTCGCTGCTTACCGAAGCA  
AGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAG  
GGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAA  
TCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTC  
TCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO: 90)之抗CD19 CD3  $\epsilon$ -CO構築體，其繼

而用作親本模板，以工程改造三個子構築體，該子構築體含有 $\epsilon$ -CO信號傳導域  
內之突變，稱為 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)、 $\epsilon$ -CO (R183K)、及 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)。為

了自原始CD3 ζ信號傳導蛋白產生子構築體，親本模板核酸3316至3651係經以下序列置換：

ε-CO：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO: 54)

ε-CO (Δ181-185)：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTC (SEQ ID NO: 79)

ε-CO (R183K)：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO: 80)

ε-CO (S178N.R183K)

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGGCGCA  
 GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
 ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACAACGGT  
 CTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO: 81)

接著，透過將T2A弗林蛋白酶可切割區域與第二代CD20 CD3 ζ (CD20z) CAR合併，以雙順反子形式組裝CD19 ζ CAR構築體及CD3 ε信號傳導域中含有CD3 ε-CO及突變之彼等，以產生兩種不同CAR之共表現，以下稱為CD19z/CD20z、CD19ε(Δ181-185)/CD20z、CD19ε(R183K)/CD20z、及CD19ε(S178N.R183K)/CD20z，如圖1所示。

**【0287】** CAR T細胞產物之製造。自健康人類捐贈者之分離材料係經洗滌，以抗CD8抗體連結之磁珠培養，且按製造商之說明書使用CliniMACS細胞分離系統(Miltenyi Biotech)加工，以富集CD8+ T細胞，其隨後被冷凍保存。將所得陰性流份洗滌，且如上所描述使用抗CD4抗體連結磁珠來處理，以富集CD4+ T細胞，其隨後被冷凍保存。經分離之CD4+及CD8+初級人類T細胞在OpTmizer CTS™ T細胞擴增基礎培養基中解凍，該培養基補充有2.6% OpTmizer CTS™ T細胞擴增補充品、2.5% CTS免疫細胞血清替代品、1%青黴素/鏈黴素/L-麩醯胺酸、及305個國際單位/mL人類介白素(IL)-2，此後稱為完全OpTmizer™培養基。將T細胞以 $1.5 \times 10^6$ 個細胞/mL之密度再懸浮於含有1.66 μg/mL抗CD28抗體（殖株28.2）之OpTmizer培養基中，且接著接種至預塗有1.23 μg/mL抗CD3抗體（殖株OKT3）之PL07袋以誘導T細胞活化（第0天）。在活化後第1天，細胞係由編碼親本雙順反子CD19z/CD20z CAR之LVV及含有MOI為10的CD19-ε-CO/CD20z CAR之構築體轉導。非轉導(NTD)樣本充當陰性

對照。在第3天將T細胞以完全OpTmizer™培養基洗滌，標準化並額外擴增9天（第3天至第9天）。在收集時間點（第9天），細胞係經冷凍保存以供未來表現評估。在擴增期間（第3天至第9天）之多個時間點，使用Vi-CELL進行細胞計數，且藉由添加完全OpTmizer™培養基將細胞密度標準化至 $0.5 \times 10^6$ 個細胞/mL。在此等時間點，將平均細胞存活率、直徑、及細胞密度記錄在Vi-CELL上。

**【0288】** CD3  $\epsilon$ -CO/CD20z CAR之表現判定。將製造的CD19z/CD20z、CD19- $\epsilon$ -CO/CD20z、及NTD細胞解凍且在OpTmizer™培養基中靜置整夜，以評估CAR表現。藉由使用huCD19-His重組肽及抗獨特型抗體(24C12)評估表現，以分別評估CD19及CD20 CAR之個別表現。評估各CAR之平行膜及細胞內表現。

**【0289】** CAR T細胞產物之製造。自健康人類捐贈者之分離材料係經洗滌，以抗CD8抗體連結之磁珠培養，且按製造商之說明書使用CliniMACS細胞分離系統(Miltenyi Biotech)加工，以富集CD8+ T細胞，其隨後被冷凍保存。將所得陰性流份洗滌，且如上所描述使用抗CD4抗體連結磁珠來處理，以富集CD4+ T細胞，其隨後被冷凍保存。經分離之CD4+及CD8+初級人類T細胞在OpTmizer CTS™ T細胞擴增基礎培養基中解凍，該培養基補充有2.6% OpTmizer CTS™ T細胞擴增補充品、2.5% CTS免疫細胞血清替代品、1%青黴素/鏈黴素/L-麩醯胺酸、及305個國際單位/mL人類介白素(IL)-2，此後稱為完全OpTmizer™培養基。將T細胞以 $1.5 \times 10^6$ 個細胞/mL之密度再懸浮於含有1.66  $\mu\text{g/mL}$ 抗CD28抗體（殖株28.2）之OpTmizer培養基中，且接著接種至預塗有1.23  $\mu\text{g/mL}$ 抗CD3抗體（殖株OKT3）之PL07袋以誘導T細胞活化（第0天）。

在活化後第1天，細胞係由編碼親本雙順反子CD19z/CD20z CAR之LVV或含有MOI為10的CD19-ε-CO (Δ181-185)/CD20z、CD19-ε-CO (R183K)/CD20z、或CD19-ε-CO (S178N.R183K)/CD20z之構築體轉導。非轉導(NTD)樣本充當陰性對照。在第3天將T細胞以完全OpTmizer™培養基洗滌，標準化並額外擴增6天（第3天至第9天）。在收集時間點（第9天），細胞係經冷凍保存以供未來使用。在擴增期間（第3天至第9天）之多個時間點，使用Vi-CELL進行細胞計數，且藉由添加完全OpTmizer™培養基將細胞密度標準化至 $0.5 \times 10^6$ 個細胞/mL。在此等時間點，將平均細胞存活率、直徑、及細胞密度記錄在Vi-CELL上。

**【0290】** 在第7天及第9天藉由流動式細胞測量術測量CAR表現。T細胞用一組螢光團接合抗體染色，且藉由流動式細胞測量術表徵，以判定轉導效率及CD4+/CD8+ T細胞比率。各CAR臂之表現評估係藉由螢光團接合之抗FMC63（抗CD19 CAR之獨特型，亦稱為CDL）及24C12（抗CD20 CAR之獨特型）抗體實現。使用KIP-1客製抗體評估總CAR轉導效率，該客製抗體結合CD19及CD20 CAR單鏈可變片段(scFv)之重鏈及輕鏈之間的惠特洛連接子。可固定細胞存活率染料允許對活細胞之特定分析。藉由與適當抗體混合在4 °C下培養30分鐘來染色細胞，隨後用染色緩衝液進行2次洗滌，且隨後藉由在室溫下於多聚甲醛（於磷酸緩衝鹽水中）中培養10分鐘來固定。在Attune NxT儀器上收集所有流動式細胞測量術資料，並使用FlowJo軟體分析資料。

**【0291】** 第0天共培養設置。在收集日（製造第9天）冷凍保存自衍生自健康捐贈者血球之T細胞所製造之T細胞產物。隨後將T細胞產物解凍並在完全R-10%培養基[補充有10%胎牛血清、青黴素鏈黴素L-麩醯胺酸、及HEPES之

RPMI-1640培養基]中整夜，之後開始與目標細胞共培養。在開始共培養之前，將各T細胞樣本之等分試樣與一組抗體-螢光團一起培養，且藉由流動式細胞測量術分析以評估轉導效率。各CAR臂之表現評估係藉由螢光團接合之抗FMC63（抗CD19 CAR之獨特型，亦稱為CDL）及24C12（抗CD20 CAR之獨特型）抗體實現。使用KIP-1客製抗體評估總CAR轉導效率，該客製抗體結合CD19及CD20 CAR單鏈可變片段(scFv)之重鏈及輕鏈之間的惠特洛連接子。接著將T細胞用CellTrace™ Violet (CTV)試劑標記，且隨後用R-10%培養基洗滌。將CTV標記之樣本之部分固定，且儲存在4°C下直至第4天，當樣本藉由流動式細胞測量術與第4天之共培養樣本同時分析，以評估CTV信號之初始水平（CTV最大值）。在R-10%培養基中（共培養第0天），將T細胞產物及表現螢光素酶之目標細胞以不同的反應物對目標(E:T)比（在3:1至1:243之範圍中）接種在一起。將T細胞產物連續稀釋3倍，而每孔之目標細胞數目保持恆定於25,000個細胞。陽性目標細胞包括Raji (CD19+/CD20+) Nalm6 MHC I/II KO (CD19+.CD20+)及ST486 (CD19+/CD20+)，而Raji CD19 KO (CD19-/CD20+)、Raji CD20 KO (CD19+/CD20-)、及K-562 (CD19-/CD20-)用作抗原陰性對照。在不存在任何目標細胞（亦即，單獨之T細胞）下培養T細胞產物，以評估在不存在抗原刺激下T細胞功能之基礎水平。在37°C下培養共培養物1或4天，且如下文所述般進行功能評估。

**【0292】** 第1天及第4天細胞毒性。T細胞介導之細胞毒性係依據以下來測量：相較於單獨接種目標細胞所發射之信號，共培養孔中目標螢光素酶信號之降低。共培養起始後第1天及第4天，以0.14 mg/mL之最終濃度將D-螢光素受質添加至共培養孔中，且培養盤於37°C下在暗處培養10分鐘。之後立即在

PerkinElmer EnVision®多模微量盤讀取儀中讀取螢光信號。T細胞介導之細胞毒性係計算如下：

細胞毒性%=[1-（關注樣本/單獨目標對照）之螢光素酶信號]\*100。

**【0293】** 第1天細胞介素產生。在共培養起始後的第1天，收集上清液並根據製造商之指示使用Meso Scale Discovery V-PLEX促炎性板1人類套組來分析細胞介素水平。具體而言，來自T細胞產物之共培養物之上清液（以1:1的E:T比接種，具有表現抗原Raji、Raji CD19剔除(KO) (CD19-CD20+)、Raji CD20剔除(KO) (CD19+CD20-)、Nalm6 MHC I/II KO剔除(KO) (CD19+CD20minimal)、ST486 (CD19+CD20+)、及K-562 (CD19-CD20-) 係針對干擾素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IL-2、及腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )由抗原接合所介導之分泌的水平進行分析。同時分析來自抗原陰性共培養物(K-562)之上清液，以評估不存在抗原下細胞介素產生之基礎水平。將所有樣本稀釋至偵測範圍內。

**【0294】** 第4天增殖。在共培養起始後第4天，收集以3:1之E:T比與目標細胞接種之T細胞產物，以抗體-螢光團板染色以識別T細胞，且藉由流動式細胞測量術分析。T細胞產物之增殖能力係藉由流動式細胞測量術分析以下來判定：將CTV染料之細胞分裂驅動稀釋對抗原表現目標細胞的反應，相較於對已經單獨培養之T細胞產物（單獨之T細胞）的反應，該單獨之T細胞係用以評估在不存在刺激下穩態增殖之基礎水平。藉由流動式細胞測量術同時分析在共培養設置（CTV最大值）當天固定之CTV標記T細胞，以評估在細胞增殖之前初始CTV信號之強度。

【0295】 CAR-T產物細胞之製造。對於各不同實驗組，細胞數目、細胞存活率、及細胞直徑係自第0至第9天進行追蹤，且總結於表15中。

表 15：經轉導之構築體之九天擴增資料

實驗組	細胞計數( $10^6$ )					存活率(%)					直徑( $\mu\text{m}$ )					
	第 1 天	第 3 天	第 6 天	第 8 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 8 天	第 9 天	第 0 天	第 1 天	第 3 天	第 6 天	第 8 天	第 9 天
NTD	8.4	6.65	55.9	90.5	110.4	92.4	85.7	87.8	92.1	92.8	7.91	8.73	10.9	10.0	9.38	9.29
CD19z/CD20z	8.4	10.1	85.3	148	235	92.4	81.0	85.0	93.4	94.8	7.91	8.73	11.2	10.0	9.54	9.49
CD19 $\epsilon$ -CO /CD20z	8.4	6.0	50.4	104	118	92.4	83.4	82.8	89.4	96.7	7.91	8.73	11.2	10.5	9.82	9.93

【0296】 第9天CAR-T產物細胞之轉導效率。使用huCD19-His重組肽及抗CD20 CAR獨特型(24C12)抗體個別檢測各CAR，經由膜及細胞內染色條件在解凍及回復的第9天隔夜細胞上測量CAR表現。在膜滲透條件下，CD19  $\epsilon$ -CO/CD20z構築體中CD19 CAR之表現自14%增加至53.5%。CD20 CAR在染色條件或構築體中之表現保持類似，在膜滲透條件下增加約11至12%。轉導百分比總結於表16中。

實驗組	轉導% (huCD19-His+) CD19 CAR		轉導% (24C12+) CD20 CAR	
	膜	胞內	膜	胞內
	NTD	N/A	N/A	N/A
CD19z/CD20z	49.23	44.9	40.1	52.6
CD19 $\epsilon$ -CO /CD20z	14.4	53.5	63.4	74

【0297】 CAR-T產物細胞之製造。對於各不同實驗組，細胞數目、細胞存活率、及細胞直徑係自第0至第9天進行追蹤，且總結於表17中。

實驗組	細胞計數( $10^6$ )				存活率(%)				直徑( $\mu\text{m}$ )			
	第1天	第3天	第6天	第9天	第0天	第3天	第6天	第9天	第0天	第3天	第6天	第9天
NTD	3.9	4.5	21	147	92.2	77.0	90.8	94.6	8.9	10.5	9.6	10.0
CD19z/ CD20z	3.9	5.6	32	159	92.2	70.1	89.3	95.3	8.9	10.9	9.9	10.0
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	3.9	4.8	26	98	92.2	71.8	84.1	88.3	8.9	10.8	10.6	10.5

CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	3.9	2.4	16	68	92.2	69.3	77.7	90.3	8.9	10.8	10.6	10.5
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	3.9	4.6	24	119	92.2	74.2	84.4	93.6	8.9	10.6	10.4	10.3

【0298】 CAR-T產物細胞之轉導效率。經由KIP-1（總）、CDL (CD19 CAR)、及24C12 (CD20 CAR)染色及隨後的流動式細胞測量術分析在製造第7天及/或第9天測量CAR表現（表18）。實驗組在第7天顯示出相當的總體及個體CAR表現，CD3  $\epsilon$ -CO突變體表現構築體為85%至98%之範圍，而CD19z/CD20z為42%至49%。對於所有構築體，CAR表現在第9天保持相對穩定。

表 18：製造期間之經轉導構築體之表現資料

實驗組	轉導% (Kip1+) 總 CAR				轉導% (CDL+) CD19 CAR				轉導% (24C12+) CD20 CAR			
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天
NTD	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CD19z/ CD20z	N/A	N/A	N/A	42.2	N/A	N/A	44.1	39.0	N/A	N/A	47.6	49.0
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	N/A	N/A	N/A	90.2	N/A	N/A	91.7	85.8	N/A	N/A	97.6	94.9
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	N/A	N/A	N/A	91.1	N/A	N/A	92.3	86.3	N/A	N/A	98.5	97.4
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	N/A	N/A	N/A	86.3	N/A	N/A	88.8	79.5	N/A	N/A	97.6	95.9

【0299】 共培養裝置第0天之CAR-T產物細胞之轉導效率。在解凍及隔夜靜置之後，染色各實驗組之樣本，以評估其回復百分比、及CAR表現。接著藉由添加NTD細胞將組別標準化至每個24C12表現之最低轉導百分比(31%)。完成此以確保所有樣本在下游檢定中具有相同數目之CAR+樣本。藉由CD20 CAR表現將產物細胞標準化並在22%至32%之範圍內（表19）。

表 19：共培養裝置第 0 天之 CAR-T 產物細胞之 CAR 表現

實驗組	轉導% (Kip1+) 總 CAR		轉導% (CDL+) CD19 CAR		轉導% (24C12+) CD20 CAR	
	標準化前/ 隔夜靜置	標準化後	標準化前/ 隔夜靜置	標準化後	標準化前/ 隔夜靜置	標準化後
NTD	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CD19z/CD20z	34.5	32.8	34.6	30.4	33.8	32.0
CD19 ε-CO (Δ181-185)/ CD20z	80.6	22.2	76.7	19.5	83.8	24.5
CD19 ε-CO (R183K)/ CD20z	81.4	19.4	75.2	15.7	85.6	22.4
CD19 ε-CO (S178N.R183K)/ CD20z	72.7	24.3	67.4	20.0	76.3	27.3

【0300】 細胞毒性.第1天（表20）及第4天（表21）讀數顯示跨所有抗原表現細胞系之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

表 20

第 1 天功能性表徵資料：三重複中 Raji 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-1.8	-2.2	-6.4	-0.7	-5.9	-0.8	5.1

	-2	-3.2	0.9	-2.8	-9.3	-0.6	-1.5
	-3.8	-8.2	-6.3	-5.8	-14.8	-4.9	-7.1
CD19z/CD20z	26.1	11.2	1.8	-0.5	-7.1	-7.5	-5.2
	24.8	6.6	4.1	1.3	-6.6	-6.7	0.3
	21.2	2.4	0.5	-3	-10.4	-9.1	-7.6
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	22.4	4.8	0.2	2.8	-8.3	-3	-2.4
	26.4	4.7	2.5	-1.5	-9.9	-0.5	-4.4
	20.8	7.8	-5.5	-2.4	-14.3	-11	-10
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	26.2	10.5	5.8	-1.3	-4.9	-7.4	-10.3
	22.4	7.3	1.1	1.8	-3.9	-5.3	-1.8
	18.8	3.1	2.3	-7.7	-12	-12.9	-11.4
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	30	10.7	4.9	0.4	-7.8	-5	-4.4
	23	11.1	3.3	2.1	-7.1	-0.1	-2
	24.7	3.2	-0.4	-5.2	-9.3	-4.8	-4.3

**表 21**  
第 4 天功能性表徵資料：三重複中 Raji 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	38.8	14.1	4.1	-1.3	-7.8	-11	-4.5
	46.3	16.4	6.4	-5.8	-10.9	-8.6	-7.9
	36.8	15.4	3.6	-10.2	-9.4	-12.8	-7
CD19z/ CD20z	83.7	35.6	20	5.3	-1.7	-7.8	-4.8
	85.2	29.8	17.1	-1.1	-10.8	-9.6	-2
	90.9	30.8	13.9	3	-11.1	-10.9	-10.8
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181- 185)/ CD20z	81.8	41.1	23.5	-0.8	-7.3	-11	-7.9
	84.3	39.7	16.3	-0.4	-13.1	-10	-8
	84.9	37.3	22.1	-0.4	-9.4	-6.4	-9.3
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	76.8	40.1	19.5	1.8	-8.4	-10.3	-7.3
	75.8	32.8	18.8	1.6	-12.9	-10.1	-6.6
	82	40.6	19.4	3.7	-16.4	-13.7	-6.4
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	82	38.6	22.6	10.7	-7.3	-8	-6.9
	84.1	35.3	19	0.1	-12.2	-8.6	-5.5
	87.5	38.5	20.1	-0.1	-8.5	-6.3	-1.6

【0301】 第1天（表22）及第4天（表23）讀數顯示跨所有抗原表現細胞系Raji CD19 KO之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-6.3	-10.3	-7.2	-7.6	-12.1	-8.9	-9.4
	4.3	1.2	-1.3	-0.7	-6.9	-5.1	-3
	-0.2	-5.2	-2.4	-4.3	-9.5	-5.3	-3
CD19z/ CD20z	22.1	6.4	0	-4.4	-9.4	-9.5	-9
	26.7	9.5	4.3	-1.1	-8.9	-6.5	-7.6
	24.9	6.5	1.4	-4.8	-11.8	-10.1	-5.6
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	23.4	5.2	-3.1	-7.3	-16.2	-11.8	-6
	27.9	8.6	1	-4.7	-10.1	-9.3	-4.2
	23.7	7.8	1.6	-12.9	-20.1	-10.5	-6
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	22.8	6.6	-3.5	-5.4	-12.4	-7.9	-6.4
	27.4	6.9	2	-7.3	-15.8	-8.6	-8.9
	22.9	7.1	-1	-6.7	-15.8	-12.8	-6.9
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	27.3	9	1.4	-3.8	-12	-10.2	-9.5
	30.1	12.5	1.6	-3.3	-13.8	-9.5	-5.2
	27.3	9.4	0.2	-4.2	-18.7	-10.1	-8.3

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	34	12	-0.3	-5.5	-9.5	-9.6	-5.9
	36	11.5	0.2	-5.3	-10.8	-8.7	N/A
	34.2	12.4	0.8	-3.5	-10.6	-7.3	-6.2
CD19z/	79.9	42.9	17.3	-3.9	-8.2	-12.8	-7.3

CD20z	81.7	44.2	16.5	-2.1	-9.1	-11.1	-8.1
	80.7	44.6	17.4	-0.9	-11.9	-12.1	-10.3
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	80.7	47.6	21.1	-1.4	-10.9	-12.3	-7
	79	47.7	19.7	2.3	-12.7	-13.9	-5.5
	82.2	47.6	18.4	-1.3	-12.1	-14.1	-7.1
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	78.9	42.3	17.8	-2.4	-14.7	-12.2	-5.7
	77.9	42.9	16.6	-0.8	-11.6	-12.4	-8.1
	79.3	44.9	15.7	-2.9	-15.4	-9.5	N/A
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	85.2	52	20.3	0.5	-13.8	-13.1	-9.2
	84.4	50.2	21.2	-0.2	-11.6	-12.2	-8.6
	85	49.2	18.7	-1.2	-12.2	-9.1	-8.1

【0302】 第1天（表24）及第4天（表25）讀數顯示跨所有抗原表現細胞系Raji CD20 KO之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

表 24							
第 1 天功能性表徵資料：三重複中 Raji CD20KO 細胞系之細胞毒性百分比							
實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	4.2	-6.8	-5	-0.7	-5	-4.2	-4.8
	9.9	-1.3	-3.7	-1.6	-5.2	-4.5	4.3
	6.3	-3.3	0.4	-2.8	-5.6	-3.1	-1.7
CD19z/ CD20z	64.7	34.4	13.1	2.2	-5.7	-8	-2.4
	66.5	35.9	20.7	6.3	-3.1	-2.3	0.1
	64.4	32.7	16	3.8	-7.6	-3.1	-1.6
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	61.1	28.6	8.9	-1.3	-9.2	-3.3	0.7
	60.5	28.9	11	3.6	-3.5	-1.8	2.9
	57.9	31.3	14.4	-4.5	-17.8	-5.2	-1
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	59.7	31.4	14.3	1.9	-8.4	-9.2	-3.1
	61	31.2	14.3	3.4	-5.9	-1.9	1.9
	58.8	29.4	8.7	-1.9	-8.3	-9.5	-4.9

CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	58.1	30.5	14.2	3.5	-7.8	-7.1	-1.3
	59.4	33.7	11.5	7.7	-7	-1.7	-4.6
	55.6	33.6	7.4	-0.8	-7.3	-6.3	-5.8

表 25

第 4 天功能性表徵資料：三重複中 Raji CD20 KO 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	47.2	14.5	-2.5	-11.5	-15.9	-11.1	-5.3
	48	10.8	0.9	-7.5	-9.3	-6.1	-3.1
	45.1	12.3	-2.4	-9.2	-9.3	-12	5.2
CD19z/ CD20z	98.8	89.6	51.9	16.8	-5.9	-4.3	-4.4
	99.5	90	58.1	26.4	0.1	3.9	-2.9
	99.4	92.3	67.4	18.9	-7.5	-4.7	6.4
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	94.9	82.2	46.7	14.9	-3.4	-8	0.3
	95.3	83.2	49	20.8	3	0.5	0.5
	95.4	89.9	63.3	21.7	-2.8	-5.3	-3.4
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	94.6	80	42.9	7.3	-1	-1.8	1.9
	95.5	83.1	44.1	13.5	-0.9	-3.1	4.9
	96.4	88.4	63	25.1	5.2	-11.8	-8.6
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	92.3	81.8	49.6	14.5	-6.9	-0.8	5
	91.8	81.4	49.3	20.5	0.2	-1.9	5.5
	93.9	88.9	68.7	14.2	-2.3	-11.7	10.1

【0303】 第1天（表26）及第4天（表27）讀數顯示跨所有抗原表現細胞系Nalm6 MHC I/II KO之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

表 26

第 1 天功能性表徵資料：三重複中 Nalm6 MHC I/II KO 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-1.2	-5.2	-8	-6.1	-11.1	-8.3	-9.5

	4.5	-1.7	-0.4	-4.8	-8.3	-6	-4.4
	3	-2	-1.9	-2.2	-6	-6.1	-4
CD19z/ CD20z	97.3	82.4	45.3	16.6	-0.8	-4.4	-4.6
	97.9	81.2	43.6	13.9	-2.9	-5.6	-1.4
	96.2	79.7	43.8	18.8	-2.4	-5.9	-4.6
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181- 185)/ CD20z	94.2	63.1	30.4	8.7	-7.3	-7.8	-7.2
	93.9	65.6	29.1	5.6	-7.5	-11.4	-6.9
	91.9	61.9	28.5	4.7	-8.2	-5.2	-3.7
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	93.2	61.4	24.7	4.4	-7.7	-8.9	-6.2
	93.1	61.2	24.9	5.1	-10.6	-7	-8
	92.4	63	27.6	1.9	-9.5	-9.1	-5.3
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	95.4	66.7	29.6	8.2	-7	-8.7	-6.9
	94.7	67.9	30	8.9	-9.7	-5.7	-6
	94.8	66.7	31.4	4.2	-6	-6.4	-6.7

表 27

第 4 天功能性表徵資料：三重複中 Nalm6 MHC I/II KO 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	6	-3.3	N/A	-15	0	-18.5	N/A
	4.8	-5.3	N/A	-16.1	-4.6	-15	N/A
	4.8	-2.3	N/A	-15.4	0.9	-19.4	N/A
CD19z/ CD20z	100	100	98.4	83.9	47.9	13.8	N/A
	100	100	98.6	84.6	52.3	14.9	N/A
	100	100	98.8	87.9	52.1	20.6	N/A
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181- 185)/ CD20z	100	99.3	80.5	20.5	-6.3	-19.1	N/A
	100	99.6	77	20.7	-12	-20.1	N/A
	100	99.8	81.8	16	-3.2	-20.6	N/A
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	100	99.3	75.4	12	-10.6	-16	N/A
	100	98.9	75.8	10.4	-11.5	-17	N/A
	100	99.8	80.5	9.8	-9.6	-18.7	N/A
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	100	100	86.1	24	-4.6	-17.5	N/A
	100	99.9	82.8	22.9	-6.2	-17.1	N/A
	100	100	90.8	24.8	-10.2	-18.7	N/A

【0304】 第1天（表26）及第4天（表27）讀數顯示跨所有抗原表現細胞系ST486之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	3.6	-5.7	-7.9	-10.3	-12.8	-10.3	7.3
	10.3	0.4	-1.2	-3.2	-7.2	-4.8	-4.7
	0.4	-3.1	-1.5	-0.6	-3.1	-2.7	0.4
CD19z/ CD20z	98.3	86.2	45.6	15.4	-7.7	-9.2	-8.2
	98.2	86.3	53.7	18.9	0.8	-5	-4.4
	97.3	85.2	51	21.7	3.4	-1.4	0.1
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	98.1	87.2	51.6	12.6	-7.4	-9.7	-7.7
	98.5	87.5	53.2	18.1	-7.8	-7.5	-4.2
	98	87.8	49.2	16.7	-0.8	0.5	-1.9
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	98.1	86.6	48	11.1	-8.4	-7.8	-5.3
	98.1	86.2	50.3	15.5	-8.1	-5.7	-8
	97.5	83.8	46.8	17.4	-1.4	-3.7	-1.7
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	98.5	89.2	55.4	15.6	-4.3	-8.2	-7.6
	98.8	90	55.3	19.8	-4.7	-4.4	-4.7
	98.4	89.7	54.7	21.5	-0.6	2.5	-2.5

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	59.2	8.5	-8.1	-12.5	0.3	-12.3	30.4
	44.5	4.5	-6.2	-9.5	1.8	-9.7	25.5
	46.5	-3.7	-13.4	-17.9	9.6	-23.9	16.2
CD19z/	100	99.9	99.2	88.1	53	24.4	22.9

CD20z	99.9	100	98.1	83.6	49.6	20.7	17.8
	99.9	99.9	99.6	84.3	46.2	7.8	10.7
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	99.9	100	98.5	80.5	39	0.9	8.4
	99.9	99.9	99.6	82.5	34.9	7.4	14.7
	99.8	99.9	99.8	80.4	27.6	1.1	1.9
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	100	100	98	76.9	29.4	2.3	8.9
	99.9	99.9	98.4	77.2	35.5	4.6	17
	99.8	99.9	99.3	71.1	27.6	-0.4	1.1
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	99.9	100	99.4	86.3	45	13	4.6
	99.9	99.9	99.2	85.5	50.3	8.4	14.2
	99.8	99.9	99.9	89.4	39.5	3.9	22.3

【0305】 第1天（表28）及第4天（表29）讀數顯示跨所有抗原表現細胞系K-562之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

表 28							
第 1 天功能性表徵資料：三重複中 K-562 細胞系之細胞毒性百分比							
實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-3.9	-9.2	-6.8	-4.5	-8.2	-11.4	-5.7
	5.1	-8.3	1.5	-0.3	0	0.3	0.8
	-1.2	-4.8	-1	-2.3	-6.8	-6.8	-1.6
CD19z/ CD20z	-8.1	-6.9	-3.7	-3.5	-12.2	-9.7	-3.7
	-3.4	-7.7	2.5	-3.3	-7	-2.4	2.2
	-1.8	-8.3	-4.9	-4.3	-8.5	-2.3	-2.6
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181- 185)/ CD20z	-0.1	-8.2	-2.1	-10.8	-15.2	-9.5	-2.1
	3.5	-10.5	-5.6	-7.8	-14.1	-12.3	-2.6
	6.5	-7.7	-8.9	-12.9	-18.9	-10.2	1.2
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	4.8	-4.9	-1	-11.6	-13.4	-9.2	-3
	5.4	-4.7	-1	-4.2	-15.3	-7.6	2.2
	7.5	-6.6	-11.2	-7.2	-15.9	-11.2	2.6

CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	-1.9	-8.3	-5.5	-10.3	-13	-8.5	-4
	5.3	-6.1	-2	-8.8	-10.6	-9.8	2.4
	6.6	-3.5	-5.9	-13.2	-18.2	-5.9	2.1

表 29

第 4 天功能性表徵資料：三重複中 K-562 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	6.3	-9.7	-14.1	-24.7	-25.6	-25.6	17.5
	2.2	-0.1	-17.4	-19.4	-20.4	-21.4	N/A
	6.4	-3.8	-14.5	-15.6	-23.2	-18.8	-9.5
CD19z/ CD20z	-8.1	-6.9	-3.7	-3.5	-12.2	-9.7	-3.7
	-3.4	-7.7	2.5	-3.3	-7	-2.4	2.2
	-1.8	-8.3	-4.9	-4.3	-8.5	-2.3	-2.6
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	-0.1	-8.2	-2.1	-10.8	-15.2	-9.5	-2.1
	3.5	-10.5	-5.6	-7.8	-14.1	-12.3	-2.6
	6.5	-7.7	-8.9	-12.9	-18.9	-10.2	1.2
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	4.8	-4.9	-1	-11.6	-13.4	-9.2	-3
	5.4	-4.7	-1	-4.2	-15.3	-7.6	2.2
	7.5	-6.6	-11.2	-7.2	-15.9	-11.2	2.6
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	-1.9	-8.3	-5.5	-10.3	-13	-8.5	-4
	5.3	-6.1	-2	-8.8	-10.6	-9.8	2.4
	6.6	-3.5	-5.9	-13.2	-18.2	-5.9	2.1

【0306】 第1天細胞介素產生。自1:1之E:T比收集上清液，並經由MSD針對IFN- $\gamma$ 、IL-2、及TNF- $\alpha$ 分泌進行分析。分析顯示，當與抗原表現細胞系Raji、Raji CD19 KO、Raji CD20 KO、Nalm6 MHC I/II KO、及ST486共培養時，所有構築體（表30及表31）分泌細胞介素。CD3  $\epsilon$ -CO突變體構築體在所有細胞系中分泌類似水平的細胞介素。當與ST486細胞系之共培養物分泌之水平相比，與Raji及Nalm6細胞系之共培養物引出更高水平的細胞介素，然而，構築

體之總階層式模式(overall hierarchical pattern)在所有細胞系中一致。另一方面，NTD對照組當單獨培養或與抗原表現細胞系培養時並未分泌任何可量測或顯著水平之細胞介素。INF $\gamma$ <1.76 pg/mL、IL-2 <0.890 pg/mL及TNF $\alpha$ <0.690 pg/mL的細胞介素測量值低於檢定的定量下限 (<LOQ)。

**表 30**  
第 1 天功能性表徵：Raji、Raji CD19 KO、及 Raji CD20 KO 細胞系中之 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 之經由 MSD 之細胞介素分析

實驗組	細胞介素	Raji Avg pg/mL	% CV	Raji CD19 KO Avg pg/mL	% CV	Raji CD20 KO Avg pg/mL	% CV
NTD	IFN- $\gamma$	152	10	113.7	14	136.3	3
	IL-2	180.3	17	17.2	18	17.16	27
	TNF- $\alpha$	6.4	41	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CD19z/ CD20z	IFN- $\gamma$	82649.3	10	43944.5	4	37889.3	11
	IL-2	4497	9	1162.23	7	1867.5	3
	TNF- $\alpha$	845.8	10	324.8	2	347.4	8
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	IFN- $\gamma$	66484.9	15	42188.2	7	28774.2	24
	IL-2	3146.7	6	1282.2	6	1397.4	16
	TNF- $\alpha$	32.6	5	56.8	18	9.8	4
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	IFN- $\gamma$	61523.6	2	42984.9	3	28355.8	3
	IL-2	3139	8	1503.8	8	1249.9	3
	TNF- $\alpha$	18.9	3	16.0	5.0	19.2	8
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	IFN- $\gamma$	55819.4	1	43493.9	6	32833.1	20
	IL-2	2184.5	2	1226.3	6	971.3	5
	TNF- $\alpha$	487.6	6	294.2	1	247.7	1

表 31

第 1 天功能性表徵：Nalm6 MHC I/II KO、ST486、及 K-562 細胞系中之 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 之經由 MSD 之細胞介素分析

實驗組	細胞介素	Nalm6 MHC I/II KO Avg pg/mL	% CV	ST486 Avg pg/mL	% CV	K562 Avg pg/mL	% CV
NTD	IFN- $\gamma$	17.7	64	176.7	16	146.7	27
	IL-2	<LOQ	<LOQ	29.58	41	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	3.8	14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CD19z/ CD20z	IFN- $\gamma$	62212.8	4	62767.7	4	12.8	12
	IL-2	2962	6	2939.7	6	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	679.4	8	627.2	2	<LOQ	<LOQ
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	IFN- $\gamma$	48370.7	6	48368.5	6	177.6	67
	IL-2	1737.9	5	1485.9	10	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	56.8	14	12.6	4	<LOQ	<LOQ
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	IFN- $\gamma$	48617.6	17	47661.9	6	177.6	67
	IL-2	1387.2	6	1435.6	11	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	48.1	16	32.2	10	<LOQ	<LOQ
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	IFN- $\gamma$	42380.4	12	45879.7	3	159.8	64
	IL-2	1360	16	1175.9	5	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	353.5	7	329.5	4	<LOQ	<LOQ

【0307】 第4天增殖。使用稀釋之Cell Trace™ Violet (CTV)標記，以評估增殖。隨著產物CAR-T細胞分裂，每次分裂都會稀釋染料，且因此相比於第0天之細胞，較低的CTV MFI係表示增殖。當單獨培養或與抗原表現細胞系培養時，在NTD對照組中見到最小的恆定性或非抗原依賴性增殖。當針對Raji、Raji CD19 KO、Raji CD20 KO、Nalm6 MHC I/II KO、ST486、及K-562細胞系培養時，所有構築體皆顯示相當的MFI水平。完整總結見表32。

表 32							
第 4 天功能性表徵資料：經由 Cell Trace™ Violet (CTV) 染色之增殖分析 Nalm6 MHC I/II KO、Raji、Raji CD19 KO、Raji CD20 KO、ST486、及 K562 細胞系。報導的值係 CTV 分布曲線的中位數。							
實驗組	Raji	Raji CD19 KO	Raji CD20 KO	Nalm6 MHC I/II KO	ST486	K562	單獨之 T 細胞
NTD	16924	17079	18037	18326	17914	17752	27568
CD19z/ CD20z	12518	12155	11410	11670	10262	20396	31696
CD19 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)/ CD20z	11910	11384	10193	11005	12433	19049	26396
CD19 $\epsilon$ -CO (R183K)/ CD20z	11723	10735	10332	11410	12489	17996	23440
CD19 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	10425	9722	8689	8289	10472	18578	25045

### 實例10

【0308】 下列實例描述利用 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)、 $\epsilon$ -CO (R183K)、及 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)信號傳導域之抗CD19 CAR，相較於具有CD3  $\zeta$ 信號傳導域之基準抗CD19對照CAR，其證實顯著改善的體內腫瘤控制。亦將此等在CD3  $\epsilon$ 信號傳導域內具有突變體之新的第二代CAR構築體相較於原始CD3  $\epsilon$ -CO構築體。所有皆成功轉導且在初級人類T細胞中表現。體內研究表明，當與CD3  $\zeta$ 基準對照相比時， $\epsilon$ -CO及 $\epsilon$ -CO突變體構築體具有優越腫瘤控制、CAR擴增、及持久性，證實利用CD3  $\epsilon$ 信號傳導域之抗CD19 CAR在體內具有增強之功效。

【0309】 構築體設計。抗CD19第二代嵌合抗原受體(CAR)，以下稱為 $\zeta$ ，具有序列

ATGGCTCTGCCTGTGACCGCTCTGCTGTTGCCCTTGCTTTACTCCTGCAC

GCCGCAAGACCCGACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGC  
CTCCCTTGGAGACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTC  
CAAGTACTTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTG  
CTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCCTCAAGATTCTCC  
GGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCA  
AGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACA  
CCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATC  
TGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCT  
GCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCCTGAGCGTTA  
CATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCTTCCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCC  
GCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAG  
CGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCA  
AGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCCTGAAGATGAACTCTCTCAAACC  
GACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAG  
CTACGCTATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTG  
CCGCCGCTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAA  
GGGAAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTT  
CTGGGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTG  
TGACCGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTG  
CTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCA  
GAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGA  
AGCAGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGG  
CCAAAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATAC  
GACGTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAG

CCAAGAAGAAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAAAGG  
ACAAGATGGCTGAGGCTTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAG  
AAGAGGAAAGGGACACGACGGACTGTACCAAGGCCTGAGCACCGCTACC  
AAGGACACCTACGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ  
ID NO: 91)作為親本模板，以進行工程改造且合成子構築體。亦製造在 $\epsilon$ -CO信  
號傳導域內含有突變體之構築體，且稱為 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)、 $\epsilon$ -CO (R183K)、及  
 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)。為產生子構築體，開始自親本模板核酸3316至3651之  
CD3 $\zeta$ 信號傳導蛋白係經以下序列置換（參見圖2）：

$\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTC (SEQ ID NO: 79)

$\epsilon$ -CO (R183K)：

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO: 80)

$\epsilon$ -CO (S178N.R183K)

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA  
ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACAACGGT  
CTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO: 81)。

【0310】 CAR T細胞產物之製造。自健康人類捐贈者之分離材料係經洗滌，以抗CD8抗體連結之磁珠培養，且按製造商之說明書使用CliniMACS細胞分離系統(Miltenyi Biotech)加工，以富集CD8+ T細胞，其隨後被冷凍保存。將所得陰性流份洗滌，且如上所描述使用抗CD4抗體連結磁珠來處理，以富集CD4+ T細胞，其隨後被冷凍保存。經分離之CD4+及CD8+初級人類T細胞在OpTmizer CTS™ T細胞擴增基礎培養基中解凍，該培養基補充有2.6% OpTmizer CTS™ T細胞擴增補充品、2.5% CTS免疫細胞血清替代品、1%青黴素/鏈黴素/L-麩醯胺酸、及305個國際單位/mL人類介白素(IL)-2，此後稱為完全OpTmizer™培養基。將T細胞以 $1.0 \times 10^6$ 個細胞/mL之密度再懸浮於含有1.66  $\mu\text{g/mL}$ 抗CD28抗體（殖株28.2）之OpTmizer培養基中，且接著接種至預塗有1.23  $\mu\text{g/mL}$ 抗CD3抗體（殖株OKT3）之T-25培養瓶以誘導T細胞活化（第0天）。在活化後第1天，細胞係由編碼親本抗CD19 CAR之LVV轉導，或以5或10之MOI由子構築體 $\epsilon$ -CO、 $\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)、 $\epsilon$ -CO (R183K)、或 $\epsilon$ -CO (S178N.R183K)轉導。非轉導(NTD)樣本充當陰性對照。在第3天將T細胞以完全OpTmizer™培養基洗滌，標準化並額外擴增6天（第3天至第9天）。在收集時間點（第9天），細胞係經冷凍保存以供未來使用。在擴增期間（第3天至第9天）之多個時間點，使用Vi-CELL進行細胞計數，且藉由添加完全OpTmizer™

培養基將細胞密度標準化至 $0.5 \times 10^6$ 個細胞/mL。在此等時間點，將平均細胞存活率、直徑、及細胞密度記錄在Vi-CELL上。

**【0311】** 在第6天及第9天藉由流動式細胞測量術測量CAR表現。T細胞用一組螢光團接合抗體染色，且藉由流動式細胞測量術表徵，以判定轉導效率及CD4+/CD8+ T細胞比。CAR表現（抗CD19 CAR）之評估藉由螢光團接合KIP-1進行。可固定細胞存活率染料允許對活細胞之特定分析。藉由與適當抗體混合在4 °C下培養30分鐘來染色細胞，隨後用染色緩衝液進行2次洗滌，且隨後藉由在室溫下於多聚甲醛（於磷酸緩衝鹽水中）中培養10分鐘來固定。在Fortessa-X20儀器上收集所有流動式細胞測量術資料，並使用FlowJo軟體分析資料。

**【0312】** 第0天共培養設置。在收集日（製造第9天）冷凍保存自衍生自健康捐贈者血球之T細胞所製造之T細胞產物。隨後將T細胞產物解凍並在完全R-10%培養基[補充有10%胎牛血清、青黴素鏈黴素L-麩醯胺酸、及HEPES之RPMI-1640培養基]中整夜，之後開始與目標細胞共培養。在開始共培養之前，將各T細胞樣本之等分試樣與抗體-螢光團一起培養，且藉由流動式細胞測量術分析以評估轉導效率。使用KIP-1客製抗體評估總轉導效率，該客製抗體結合單鏈可變片段(scFv)之重鏈及輕鏈之間的惠特洛連接子。接著將T細胞用CellTrace™ Violet (CTV)試劑標記，且隨後用R-10%培養基洗滌。將CTV標記之樣本之部分固定，且儲存在4°C下直至第4天，當樣本藉由流動式細胞測量術與第4天之共培養樣本同時分析，以評估CTV信號之初始水平（CTV最大值）。在R-10%培養基中（共培養第0天），將T細胞產物及表現螢光素酶之目標細胞以不同的反應物對目標(E:T)比（在3:1至1:243之範圍中）接種在一起。將T細胞

產物連續稀釋3倍，而每孔之目標細胞數目保持恆定於25,000個細胞。陽性目標細胞包括Raji (CD19+)、Nalm6 (CD19+)、ST486 (CD19+)、及Raji CD19 KO (CD19-)、或K562 (CD19-)。作為對照，在不存在任何目標細胞（亦即，單獨之T細胞）下培養T細胞產物，以評估在不存在抗原刺激下T細胞功能之基礎水平。在37°C下培養共培養物1或4天，且如下文所述般進行功能評估。

**【0313】** 第1天及第4天細胞毒性。T細胞介導之細胞毒性係依據以下來測量：相較於單獨接種目標細胞所發射之信號，共培養孔中目標螢光素酶信號之降低。共培養起始後第1天及第4天，以0.14 mg/mL之最終濃度將D-螢光素受質添加至共培養孔中，且培養盤於37°C下在暗處培養10分鐘。之後立即在PerkinElmer EnVision®多模微量盤讀取儀中讀取螢光信號。T細胞介導之細胞毒性係計算如下：

細胞毒性%=[1-（關注樣本/單獨目標對照）之螢光素酶信號]\*100。

**【0314】** 第1天細胞介素產生。在共培養起始後的第1天，收集上清液並根據製造商之指示使用Meso Scale Discovery V-PLEX促炎性板1人類套組來分析細胞介素水平。具體而言，來自T細胞產物之共培養物之上清液（以1:1的E:T比接種，具有表現抗原Raji、Nalm6、及ST486）係針對干擾素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IL-2、及腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )由抗原接合所介導之分泌的水平進行分析。同時分析來自不存在目標細胞（單獨之T細胞）或抗原陰性共培養物（Raji CD19 KO或K562）下培養之T細胞之上清液，以評估不存在抗原下細胞介素產生之基礎水平。將所有樣本稀釋至偵測範圍內。

**【0315】** 第4天增殖。在共培養起始後第4天，收集以1:1之E:T比與目標細胞接種之T細胞產物，以抗體-螢光團板染色以識別T細胞，且藉由流動式細胞測量術分析。T細胞產物之增殖能力係藉由流動式細胞測量術分析以下來判定：將CTV染料之細胞分裂驅動稀釋對抗原表現目標細胞的反應，相較於對已經單獨培養之T細胞產物（單獨之T細胞）的反應，該單獨之T細胞係用以評估在不存在刺激下穩態增殖之基礎水平。藉由流動式細胞測量術同時分析在共培養設置（CTV最大值）當天固定之CTV標記T細胞，以評估在細胞增殖之前初始CTV信號之強度。

**【0316】** 連續殺滅。將產物CAR-T細胞在第0天針對CAR表現進行標準化，類似於上述共培養物設置。T細胞與抗原表現Nalm6目標系係以1:1 E:T比率在R-10%培養基中共培養。每3至4天，用新R-10%培養基中的額外25,000個Nalm6 (CD19+)目標細胞對培養物進行攻擊。添加更多目標細胞之每一輪皆測量細胞毒性（類似於上述細胞毒性來評估）及CD3+ T細胞計數（在Attune細胞儀上分析）。對於第9至13輪，在添加Nalm6目標細胞之前，總孔體積被分成1/3。

**【0317】** CAR-T產物細胞之製造。對於各不同實驗組，細胞數目、細胞存活率、及細胞直徑係自第0至第9天進行追蹤，且總結於表33及表34中。

實驗組	細胞計數( $10^6$ )				存活率(%)				直徑( $\mu$ M)			
	第0天	第3天	第7天	第9天	第0天	第3天	第7天	第9天	第0天	第3天	第7天	第9天
NTD	4.0	5.1	47.1	106.0	88.1	83	75.8	83.6	8.0	11.4	9.9	10.1

ζ-CO	4.0	4.9	44.2	118.0	88.1	76.6	73.5	81.6	8.0	11.9	10.0	10.1
ε-CO	4.0	5.1	38.0	92.2	88.1	83.5	73.4	81.4	8.0	11.8	10.2	10.2
ε-CO (Δ181-185)	4.0	4.7	39.9	117.0	88.1	72.4	76.0	76.2	8.0	11.9	10.2	10.1
ε-CO (R183K)	4.0	4.6	37.8	92.5	88.1	82.6	71.9	82.7	8.0	12.4	10.1	10.1
ε-CO (S178N.R183K)	4.0	5.0	47.1	120.2	88.1	73.8	76.7	85.2	8.0	11.7	10.2	10.1
ζ1xx	4.0	5.1	52.0	191.4	88.1	79.3	77.0	87.0	8.0	12.4	10.0	9.9

表 34

經轉導構築體之九天擴增資料-捐贈者 2

實驗組	細胞計數( $10^6$ )				存活率(%)				直徑( $\mu$ M)			
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天
NTD	6.6	13.7	130.2	540.4	78.6	79.5	91.2	96.6	9.3	11.0	9.7	10.1
ε-CO	3.3	5.8	37.1	136.0	78.6	77.5	82.5	91.9	9.3	11.0	9.9	10.1
ε-CO (Δ181-185)	3.3	4.6	41.6	132.0	78.6	75.5	88.1	93.5	9.3	11.6	9.7	10.0
ε-CO (R183K)	3.3	5.3	35.4	122.0	78.6	76.8	83.5	92.1	9.3	11.1	9.9	9.8
ε-CO (S178N.R183K)	3.3	5.6	44.0	158.2	78.6	75.8	89.4	93.6	9.3	10.6	9.8	10.1
ζ1xx	3.3	5.4	45.7	180.7	78.6	82.2	89.0	93.0	9.3	11.7	9.5	9.9

【0318】 CAR-T產物細胞之轉導效率。經由KIP-1染色及後續流動式細胞測量術分析在製造的第6天或第7天及第9天測量CAR表現（表35）。實驗組在第7天顯示出相當的CAR表現，捐贈者1之CAR表現在83%至95%之範圍內，且在第6天，捐贈者2之CAR表現在82%至96%之範圍內。對於兩位捐贈者，CAR表現在第9天保持相對穩定。

表 35

製造期間之經轉導構築體之表現資料

實驗組	轉導% (Kip1+) – 捐贈者 1				轉導% (Kip1+) – 捐贈者 2			
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天

NTD	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
ζ-CO	N/A	N/A	96.5	93.1	N/A	N/A	N/A	N/A
ε-CO	N/A	N/A	98.0	94.9	N/A	N/A	94.9	88.1
ε-CO (Δ181-185)	N/A	N/A	96.3	89.6	N/A	N/A	93.2	82.2
ε-CO (R183K)	N/A	N/A	98.3	95.2	N/A	N/A	95.1	88.0
ε-CO (S178N.R183K)	N/A	N/A	97.1	89.7	N/A	N/A	95.5	84.6
ζ1xx	N/A	N/A	91.4	83.2	N/A	N/A	82.8	84.1

【0319】 共培養裝置第0天之CAR-T產物細胞之轉導效率。在解凍及隔夜靜置之後，染色各實驗組之樣本，以評估其回復百分比、及CAR表現。接著藉由添加NTD細胞將組別標準化至最低轉導百分比（捐贈者1為75%及捐贈者2為74%）。完成此以確保所有樣本在下游檢定中具有相同數目之CAR+樣本。產物細胞成功標準化，捐贈者1在68%至73%之範圍，且捐贈者2在73%至78%之範圍（表36）。

表 36  
共培養裝置第 0 天之 CAR-T 產物細胞之 CAR 表現

實驗組	轉導% (Kip1+) – 捐贈者 1		轉導% (Kip1+) – 捐贈者 2	
	標準化前/隔夜靜置	標準化後	標準化前/隔夜靜置	標準化後
NTD	N/A	N/A	N/A	N/A
ζ-CO	90	72	N/A	N/A
ε-CO	92	68	85	77
ε-CO (Δ181-185)	83	72	72	78
ε-CO (R183K)	92	70	84	78
ε-CO (S178N.R183K)	83	73	79	78
ζ1xx	75	69	79	73

【0320】 細胞毒性.第1天（表37）及第4天（表38）來自捐贈者1之讀數顯示跨抗原表現細胞系Nalm6之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	16.1	12.3	11.9	14.1	4.3	5.9	7.1
	4.8	5.6	0.9	-10.6	-17.3	-12.2	-3.5
	3.9	-0.1	1.6	-7.3	-13.1	-9.5	0.2
ζ-CO	99.9	98.8	82.8	56.2	25.3	17.1	8.9
	100	98.4	80.6	50.4	14.6	-4.8	0.8
	99.8	96.7	74.2	44.5	10.8	-3	2.3
ε-CO	99.9	97.9	80.9	51.8	21.7	17.5	10.8
	99.9	97.8	79.2	42.8	9.6	-10	0.9
	99.9	96	72.7	36.3	3.1	-5.9	4.7
ε-CO (Δ181-185)	99.9	98.1	80.9	48.3	17.3	13.5	2.3
	99.9	96.9	77.4	36.3	4.4	-11.7	-4.6
	99.9	95.2	71.7	28.6	-3.2	-12	0.1
ε-CO (R183K)	99.9	97.6	80.2	45.7	19.4	11.9	1.3
	99.9	97	79.1	43.1	8.9	-7.7	-4.5
	99.6	95.2	72.3	35.3	-3.1	-8	-3.2
ε-CO (S178N.R183K)	99.9	99.3	87.2	55.4	16.8	4.2	-0.6
	99.9	99.1	84.1	48.8	12.5	-3.3	-5.5
	99.8	97.9	80.2	42.8	9.9	-5.8	0.1
ζ1xx	99.9	99.4	89	61.9	26.1	13.8	7.7
	100	99.2	86.4	55.6	16.9	-4.4	5.9
	99.8	97.5	81.6	44.5	12.5	-9.6	2.1

表 38

第 4 天來自捐贈者 1 之功能性表徵資料：三重複中 Nalm6 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	15.2	0.8	-9.6	-10.7	-9.6	-11.1	0.6
	12.9	-2.6	-12.8	-13.2	-18.3	-14	-6.2
	11	0.3	-9.7	-12.6	-12.5	-11.7	-2.5
ζ-CO	100	100	98.4	83.9	47.9	13.8	7.1
	100	100	98.6	84.6	52.3	14.9	9.4
	100	100	98.8	87.9	52.1	20.6	10.2
ε-CO	100	100	97.8	83.4	41.8	12.5	9.3
	100	100	98.3	81.2	44.8	7.8	5.3
	100	100	98.6	86.7	47	6.7	10.2
ε-CO (Δ181-185)	100	100	98.9	83.6	41.7	9.2	8.8
	100	100	98.6	85	41.2	11.6	1.2
	100	100	99.5	90	48.4	15	4.8
ε-CO (R183K)	100	100	98	81	45.6	18.1	4.4
	100	100	97.8	82.9	44.6	12.7	2.9
	100	100	98.9	84.6	45.5	14.7	2.9
ε-CO (S178N.R183K)	100	100	99.3	88	55.9	16.8	8.7
	100	100	99.6	89.9	56	15	4.7
	100	100	99.8	92.8	65.4	17.9	6.6
ζ1xx	100	100	99.4	90.5	56.4	18.5	6.7
	100	100	99.4	90.3	61.5	20.5	15
	100	100	99.5	91.8	65.8	26.7	15.4

【0321】 第1天（表39）及第4天（表40）來自捐贈者1之讀數顯示跨抗原表現細胞系Raji之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

表 39

第 1 天來自捐贈者 1 之功能性表徵資料：三重複中 Raji 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243

NTD	8.9	-2.3	-10.2	-10	-13.6	-23.6	-19.7
	15.9	7.2	-1	-15.6	-8.8	-32.8	-1.3
	8.1	2.1	-0.1	-26.4	-32.8	-34.7	2.2
ζ-CO	85.6	58.5	19.7	-10.7	-16.1	-29.6	1.2
	86.2	59.2	29.7	-11.8	-19.9	-28.7	8.2
	83.5	51.6	18	-20.2	-27.9	-39.7	-5.8
ε-CO	80	50.4	17.3	-16.7	-20.5	-21.6	6.3
	78.8	50.4	20.6	-22.1	-23	-30.8	3.5
	76.8	44.6	19.7	-18.5	-36.4	-36.8	-7.7
ε-CO (Δ181-185)	80	48.6	21.4	-4.9	-19.6	-30.9	-20.1
	81.2	48.9	22.5	-23.1	-19.3	-33.1	1.2
	80	41.2	17.7	-30.4	-31.9	-36.7	-6.6
ε-CO (R183K)	78.3	45.9	21.1	-13.2	-21.6	-25.8	-10.1
	78	45.3	27.4	-11.3	-21.1	-24.6	7.3
	80	40.2	13.4	-28.5	-39	-37.8	1
ε-CO (S178N.R183K)	87.4	57.6	27.1	-5.9	-19.8	-18.1	-4.1
	87.2	57.6	26.6	-13.4	-25.7	-25.4	3.6
	87.1	50.7	25.9	-32	-19.9	-25.3	1.3
ζ1xx	92.1	65.3	19.3	-4.6	-17.4	-19.1	-7.2
	93	67.5	37.6	-9.5	-13.5	-20.8	-5.7
	91.9	59.1	32	-19.6	-32.3	-34.1	3.9

表 40

第 4 天來自捐贈者 1 之功能性表徵資料：三重複中 Raji 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	42.6	21.1	7.8	2.9	-3.2	-4.3	-5.1
	35.6	16.5	8.3	3	-3.9	-3.9	-2.9
	36.6	16.5	4	-2.9	-7.9	-7.1	-2.5
ζ-CO	99.8	92.3	19.4	0.6	0.4	-3.7	-2.9
	99.8	93.9	14.1	-3.6	-4.7	-8.2	-1.5
	99.5	92.3	18.9	-0.3	-3.4	-9.3	-6.7
ε-CO	99.7	74	6.5	2.2	-4.5	-3.7	-5.3
	99.6	73.7	9.7	-6.7	-7.2	-4.5	-5.5
	99.7	76	12.4	0.1	-4.7	-6.8	-1

$\varepsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)	99.3	70.3	4.4	1.6	-4.2	-1.6	-3.8
	99.2	62.9	3.6	-1.8	-4.1	-4.7	-9.3
	99.3	65.3	5.4	3	-3.9	-7.2	-2
$\varepsilon$ -CO (R183K)	99.8	76.5	11.6	3.1	-3.6	-8.1	-3.6
	99.8	73.1	5.1	0.6	2.9	3.1	-3
	99.8	81	7.8	0.7	-3.2	-9	0
$\varepsilon$ -CO (S178N.R183K)	99.7	91.1	12	0	-3.5	-9.9	4.7
	99.8	90.4	8.5	1.4	-2.1	-1	-6.8
	99.7	88.6	13.8	2.1	-1.2	-6.8	-6.9
$\zeta$ 1xx	99.7	95.9	24.7	-3.6	0	-7.2	-3.1
	99.7	94.6	20.3	-1.4	-2.7	-8.4	-6.8
	99.7	95.6	24.4	-2.1	-5.6	-8.2	-9

【0322】 第1天（表41）及第4天（表42）來自捐贈者1之讀數顯示跨抗原表現細胞系ST486之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	12.4	0.8	-11.6	-16.5	-19.9	-19.6	-10.7
	18	4	-6.6	-14	-22.3	-19.1	-5.1
	8.5	1.8	-2.7	-11.1	-11.7	-6.8	-5.8
$\zeta$ -CO	99.6	98.7	85.2	47.8	6.7	-14.8	-3.1
	99.7	98.5	84.2	47.7	6.9	-15.5	-2
	99.6	98.8	88.4	49.8	17	-3.2	-2.4
$\varepsilon$ -CO	99.7	96.3	82	31.9	-0.3	-14.8	-5.1
	99.7	98.1	83.4	36.3	3	-15	-1.9
	99.6	95	83.2	48.4	10.8	-1.9	-4.1
$\varepsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)	99.4	98.1	80	32.5	-0.4	-15	-6.1
	99.3	95.5	78.1	39.8	0.1	-14.2	-6.7
	99.4	98.1	85.7	42.3	8.1	-8.7	-2.6
$\varepsilon$ -CO (R183K)	99.4	95.2	79.5	37	-2.9	-13	-6.1

	99.4	96.9	80.4	31.1	-2.5	-13.5	-2.9
	99.6	95.9	83.4	47	11	-2.9	-3.4
$\epsilon$ -CO (S178N.R183K)	99.6	98.9	87.7	49.9	8.2	-9.3	-5
	99.6	97	86.8	48.1	8	-5.6	-1
	99.6	99.1	90.3	54.8	19.7	2.2	1.2
$\zeta$ 1xx	99.7	99.2	90.1	53.7	12.1	-12.3	-7.5
	99.7	98.9	91.6	55.9	6.1	-6	-2.6
	99.6	98.1	91.4	61.5	17.8	-3.5	-2.9

表 42

第 4 天來自捐贈者 1 之功能性表徵資料：三重複中 ST486 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	66.1	-1.8	-21.9	-25.9	-31.6	-28.9	-6.5
	68.6	0.5	-12.3	-18.1	-23.8	-18.3	-5.8
	63.5	0.3	-13.1	-22.5	-29.3	-17.3	-7.3
$\zeta$ -CO	100	99.9	99.9	94.8	64.2	30	22.4
	100	99.8	99.9	93.4	65.3	39.5	19.7
	99.9	99.9	99.9	93.7	68.8	31	21
$\epsilon$ -CO	99.9	100	100	92.6	55.3	16.4	14.9
	100	100	99.9	88	61.1	28	15.1
	99.9	100	99.9	92.6	58.8	23.1	17.4
$\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)	100	99.9	100	93.8	63.3	29.2	6.4
	99.9	100	99.9	91.1	62.5	34.2	4.3
	99.9	100	100	94.4	62.7	23.3	1
$\epsilon$ -CO (R183K)	100	99.9	100	92.8	56.3	18.9	1.4
	100	99.8	99.7	89.1	58.1	29.5	12.4
	99.9	99.9	100	90.9	60.5	23.7	11.8
$\epsilon$ -CO (S178N.R183K)	100	100	99.9	97.2	71.2	29.4	14.6
	99.9	99.9	99.9	96.1	67.9	41.2	23.5
	99.9	99.9	99.9	97.6	75.2	40.2	7.4
$\zeta$ 1xx	100	100	99.9	98.5	69.3	30.8	9.8
	99.9	99.9	99.9	98.1	74.8	31.8	12.6
	99.9	99.9	100	95.9	67.7	37.8	12.2

【0323】 第1天（表43）及第4天（表44）來自捐贈者2之讀數顯示跨抗原表現細胞系Nalm6之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-4.3	3.4	-6	-4.7	-6.1	-6.2	-5.5
	2.2	4.5	-2.2	-3.4	-3.8	-4	-5.8
	1.8	7.5	2.4	-2.5	-3.5	-5.6	-6.6
ε-CO	97.1	86	55	20.4	4.1	-3.6	-3.4
	98.4	87.2	54.6	18.1	3.6	-3.8	-3.2
	99.2	91.7	55.3	20.5	2.8	-4	-4.1
ε-CO (Δ181-185)	94.5	82.5	50.9	17	0.8	-2.1	-3.9
	98.1	83.2	50.9	20.1	0.6	-2.4	-2.5
	99.4	88.7	48.8	16.6	-0.6	-4.8	-4
ε-CO (R183K)	97.8	86	55.3	22.8	5.8	1.5	-6.3
	98.2	87.2	55.4	20.1	7.4	-1.5	-7
	99.6	90.5	56.4	19.2	4.3	-1.3	-4.2
ε-CO (S178N.R183K)	96.5	86.7	54.3	22	4.4	-1.1	-2.4
	98.2	87.9	53.2	21	1.5	-1.1	-5.3
	99.7	92.4	56	17	3.3	-3.7	-5.5
ζ1xx	96.2	85	58.4	23.5	3.6	-0.5	-3.1
	96.9	84.9	55.7	24.7	5.5	-0.7	-5.3
	99.4	91.3	61.1	21.4	5.1	-3	-2.6

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	23.4	-3	-6.1	-5.2	-4.4	-4	14.2

	26.2	0.9	-17.6	-13	-9.6	-11	13
	25	6	-14	-14.2	-7	-6.1	12.9
ε-CO	100	99.5	93.5	69.2	29.5	3.7	14
	100	99.8	96.7	67.2	28	-1.6	12
	100	100	99.1	78.5	18.4	-2.6	14.9
ε-CO (Δ181-185)	100	100	95.8	67	24.5	0	13.2
	100	99.9	96.1	73.9	25	-6	12.5
	100	100	99.4	77.4	22	-3.8	17.3
ε-CO (R183K)	100	99.7	94.4	73.7	31.8	2.1	12.4
	100	100	94.5	69.2	27.3	1.2	16.6
	100	100	99	78.4	24.4	-7.4	16
ε-CO (S178N.R183K)	100	100	94.5	72.1	29.7	4	11
	100	100	96.2	75.3	24.5	-2	11.2
	100	100	99.5	82.5	30.7	-2.4	13.5
ζ1xx	100	99.8	95.1	71.3	30.6	6.4	11.7
	100	99.8	95.7	71.5	31.3	1	15.5
	100	100	99.1	81.3	29.7	8.1	18

【0324】 第1天（表45）及第4天（表46）來自捐贈者2之讀數顯示跨抗原表現細胞系Raji之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

表 45							
第 1 天來自捐贈者 2 之功能性表徵資料：三重複中 Raji 細胞系之細胞毒性百分比							
實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-7	2	-6.7	-1.5	-6.2	-9.2	-10.9
	-2.7	2	0.6	-4.7	-5.3	-5.6	-2.7
	-3.8	0.6	-2.1	-3.4	-4.7	-4	-3.1
ε-CO	62.7	37.6	13.6	1.8	-2.2	-4.1	-3.4
	64.2	33.8	13	2.6	-3.2	-5.5	-3.1
	67.6	35.3	12.1	-1.3	-5.2	-4.6	-2.3
ε-CO (Δ181-185)	54.7	32.1	11.4	-0.1	-3.1	-4.7	-5.2
	57.2	28.8	11.9	-0.2	-3.8	-6.3	-2.6

	60.3	31	9.4	1.3	-5.4	-2.9	-2.8
ε-CO (R183K)	64	38	9.6	1.9	-6.2	-5.7	-4.1
	64.4	35.8	15.5	1.3	-3.5	-6.2	-2.5
	68.8	39	11.1	2.3	-4.6	-4.6	-4.2
ε-CO (S178N.R183K)	60.2	32.9	10.1	4.3	-3.2	-5.3	-2.8
	62.1	33.1	14.7	2.1	-2.1	-6.2	-1.5
	63.8	36.4	13.6	2.2	-4	-3.8	-2.8
ζ1xx	62.2	37.6	8.9	0.8	-4.7	-6.8	-6.6
	64.8	36.1	8.3	-0.8	-6	-6.1	-4.8
	67.6	35.9	9.7	-1	-6.6	-6.6	-4.2

表 46

第 4 天來自捐贈者 2 之功能性表徵資料：三重複中 Raji 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	16.6	14.7	-5.4	-3.1	-5.5	-6.6	13.1
	10.2	6.6	-15.2	-11.5	-14	-13.1	9.8
	3.9	6.2	-22.6	-21.8	-16.5	-20	8.8
ε-CO	100	98.4	51.8	16.7	5.7	1.6	20.7
	100	98.9	64.7	25.1	0.6	-4	16.9
	100	98.5	67.8	23.9	1.3	-10.9	16.2
ε-CO (Δ181-185)	99.8	93	41.9	12.4	2.3	1.9	16.9
	99.7	94.2	46.5	12.2	-2.4	-6	14.1
	99.5	94	53.9	11.9	-8.7	-11.4	14.5
ε-CO (R183K)	100	98.1	52	19.3	4	-0.6	22
	100	98.6	58.4	16.5	3.8	-4.5	18.7
	100	98.1	65.6	20.3	-1.3	-9.1	18.7
ε-CO (S178N.R183K)	99.9	96.3	51	19.6	5.8	0.9	20.1
	99.9	97.5	63.9	20.9	1	-4	15.9
	99.9	96.6	63.5	20.9	-0.2	-12.1	14.7
ζ1xx	100	95.2	43.6	18.1	4.4	3.2	18.9
	99.9	96.8	55.6	16.6	-1.7	-6.3	16.3
	99.9	97.6	62.2	11.6	-0.6	-9.1	12.9

【0325】 第1天（表43）及第4天（表44）來自捐贈者2之讀數顯示跨抗原表現細胞系Nalm6之劑量依賴性細胞毒性，構築體之間不具有顯著差異。

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	9.1	5.5	-3.4	-2.9	-3.9	-5.1	-1.8
	8	7.8	-2.3	-1.9	-1.6	-1.3	-1.8
	3.9	6	0.3	-1.8	-5	-4	-6.9
ε-CO	95.8	83.2	52.4	17.8	4.1	-6.1	0.2
	96.1	83.5	48.3	17.9	1.9	-0.6	-1.8
	96.4	83	48.6	15.8	-4.3	-7.2	-1.2
ε-CO (Δ181-185)	94.6	81.1	43.9	16	3.3	2.1	-3.9
	95.6	80.6	41.6	12.6	0.9	-3.8	-2.2
	95.8	81.4	43.1	11.3	-1.9	-3.1	-4.7
ε-CO (R183K)	94.2	81.7	49.7	18.7	4.3	2.2	-3.9
	96.1	84.4	48.3	19.3	4.8	-1.4	-2.5
	95.5	81.2	49.2	17.3	-1.9	-3.3	-0.9
ε-CO (S178N.R183K)	95.1	81.6	47	20.6	1.8	-4.8	-2.4
	95.7	81.6	49.1	16.7	4.7	1	1.9
	96.1	80.2	45.7	14.9	0.7	-3.3	0.7
ζ1xx	94.7	79.3	51.8	20.9	2.1	-4.9	-5
	95.6	82.8	50.7	20	4.1	-2.3	-0.8
	95.5	83	49.2	16.4	0.6	-4.2	-6.4

實驗組	E:T 比						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	60	10.6	-10.7	-15.7	-13.8	-12.4	0.3
	81.7	5.9	-21.7	-23.8	-27.8	-25.5	-13.6
	98.5	3.5	-13.6	-22.6	-28	-22.1	-15.7

ε-CO	100	99.9	97.7	81.4	44.9	6	5.2
	100	99.9	98.4	78.2	38.5	-0.3	-4.9
	100	99.9	99.2	82.5	28.7	-3.9	-2.1
ε-CO (Δ181-185)	100	100	98.6	81.2	27.5	1.4	9.9
	100	99.9	98.4	70.8	18.3	-7.3	0
	100	99.9	99.3	79.5	14.8	-9.9	0.9
ε-CO (R183K)	99.9	99.9	98.6	80.9	37.9	3.2	6.6
	100	99.9	98	73.2	18	0.4	3.4
	100	100	99.4	78.4	19.1	-7.9	4.4
ε-CO (S178N.R183K)	99.9	99.9	98.2	80.6	35.2	5	8.7
	99.9	99.8	98.5	79.4	36.4	0.4	4
	100	99.9	99.3	85.3	20.8	-3.8	0.9
ζ1xx	99.9	99.9	97.2	77	36.2	11.2	7.5
	100	99.9	97.7	73.3	33.7	8.5	-7.2
	100	99.9	98.9	79.9	30	-10.7	-1.8

【0326】 第1天細胞介素產生。自1:1之E:T比收集上清液，並經由MSD針對IFN- $\gamma$ 、IL-2、及TNF- $\alpha$ 分泌進行分析。分析顯示，當與抗原表現細胞系Raji、Nalm6、及ST486共培養時，來自捐贈者1（表49）及捐贈者2（表50）之所有構築體皆分泌細胞介素。ε-CO構築體在所有細胞系中皆分泌類似水平的細胞介素。當與ST486細胞系之共培養物分泌之水平相比，與Raji及Nalm6細胞系之共培養物引出更高水平的細胞介素，然而，構築體之總階層式模式(overall hierarchical pattern)在所有細胞系中一致。另一方面，NTD對照組當單獨培養或與抗原表現細胞系培養時並未分泌任何可量測或顯著水平之細胞介素。INF $\gamma$ <1.76 pg/mL、IL-2 <0.890 pg/mL及TNF $\alpha$ <0.690 pg/mL的細胞介素測量值低於檢定的定量下限 (<LOQ)。

表 49

第 1 天來自捐贈者 1 之功能性表徵資料：

Nalm6、Raji、及 ST486 細胞系中之 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 之經由 MSD 之細胞介素分析

實驗組	細胞介素	Nalm6 Avg pg/mL	% CV	Raji Avg pg/mL	% CV	ST486 Avg pg/mL	% CV	單獨之 T細胞 Avg pg/mL	% CV
NTD	IFN- $\gamma$	80.34	47.31	107.1	34.0	48.8	74.4	9.5	0
	TNF- $\alpha$	7.455	89.23	4.6	17.0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	IL-2	<LOQ	<LOQ	25.8	10.7	7.6	0.0	<LOQ	<LOQ
$\zeta$ -CO	IFN- $\gamma$	59492	9.795	87703.0	6.4	21184.0	4.4	40.8	28.2
	TNF- $\alpha$	787.7	2.009	886.7	4.6	159.4	6.6	<LOQ	<LOQ
	IL-2	2537	2.639	3946.0	5.8	355.9	2.9	<LOQ	<LOQ
$\epsilon$ -CO	IFN- $\gamma$	46010	15.13	77696.0	14.0	14368.0	11.2	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	491	3.374	609.1	5.7	102.0	6.8	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1369	4.467	2492.0	5.4	176.7	14.1	<LOQ	<LOQ
$\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)	IFN- $\gamma$	39789	19.61	42344.0	1.6	9089.0	4.2	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	457.5	0.9958	439.8	6.0	67.5	5.0	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1233	3.23	1576.0	1.2	142.1	2.7	<LOQ	<LOQ
$\epsilon$ -CO (R183K)	IFN- $\gamma$	47032	10.03	65030.0	12.5	13994.0	7.2	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	514.3	6.333	608.6	3.5	94.4	7.0	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1458	1.115	2253.0	5.5	130.4	10.1	<LOQ	<LOQ
$\epsilon$ -CO (S178N.R183K)	IFN- $\gamma$	40935	1.924	61333.0	6.1	627.1	14.2	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	384	2.205	461.5	6.3	63.2	6.3	<LOQ	<LOQ
	IL-2	864.7	1.906	1729.0	4.8	101.1	9.6	<LOQ	<LOQ
$\zeta$ 1xx	IFN- $\gamma$	47208	8.041	87703.0	12.9	6814.0	11.8	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	671	2.794	886.7	4.5	70.8	4.7	<LOQ	<LOQ
	IL-2	974.2	6.685	3946.0	5.5	44.2	8.1	<LOQ	<LOQ

表 50

第 1 天來自捐贈者 2 之功能性表徵資料：

Nalm6、Raji、及 ST486 細胞系中之 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 之經由 MSD 之細胞介素分析

實驗組	細胞介素	Nalm6 Avg pg/mL	% CV	Raji Avg pg/mL	% CV	ST486 Avg pg/mL	% CV	單獨之 T 細胞 Avg pg/mL	% CV
NTD	IFN- $\gamma$	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	IL-2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
$\epsilon$ -CO	IFN- $\gamma$	22590	6.817	25597	13.68	7747	8.423	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	337	8.108	364.9	4.323	149	4.631	<LOQ	<LOQ
	IL-2	561.2	3.67	890.4	7.355	162.8	6.672	<LOQ	<LOQ
$\epsilon$ -CO ( $\Delta$ 181-185)	IFN- $\gamma$	21800	25.5	20054	17.09	7024	24.7	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	334.4	8.974	304.8	2.257	114.8	7.499	<LOQ	<LOQ
	IL-2	738.4	3.888	863	8.073	177.6	13.02	<LOQ	<LOQ
$\epsilon$ -CO (R183K)	IFN- $\gamma$	20059	15.68	25805	9.312	7617	2.417	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	271.2	6.115	310.6	4.641	109.2	3.469	<LOQ	<LOQ
	IL-2	406.1	6.488	703.8	9.69	107.8	6.429	<LOQ	<LOQ
$\epsilon$ -CO (S178N.R183K)	IFN- $\gamma$	21088	7.545	23819	3.331	6920	4.379	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	288.3	5.261	319.1	1.502	110.2	2.425	<LOQ	<LOQ
	IL-2	644.9	4.876	932.1	4.962	202.9	6.91	<LOQ	<LOQ
$\zeta$ 1xx	IFN- $\gamma$	38985	8.731	54426	21.61	13036	17.44	<LOQ	<LOQ
	TNF- $\alpha$	649.6	6.788	649.1	6.535	195.2	6.075	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1054	6.141	1589	6.852	225.1	4.065	<LOQ	<LOQ

【0327】 第4天增殖。使用稀釋之Cell Trace Violet (CTV)標記，以評估增殖。隨著產物CAR-T細胞分裂，每次分裂都會稀釋染料，且因此相比於第0天之細胞，較低的CTV MFI係表示增殖。當單獨培養或與抗原表現細胞系培養時，在NTD對照組中見到最小的恆定性或非抗原依賴性增殖。當針對Raji、Nalm6、及ST486細胞系培養時，所有構築體顯示相當的MFI水平。對捐贈者1之完整總結見表51，捐贈者2見表52。

表 51

第 4 天功能性表徵資料：經由 Cell Trace Violet (CTV) 染色之增殖分析 Raji、Nalm6、及 ST486 細胞系。報導的值係 CTV 分布曲線的中位數。

實驗組	Raji	Nalm6	ST486	單獨之 T 細胞
NTD	12156	14618	14754	19120
ζ-CO	3926	3305	2373	19256
ε-CO	4924	4594	2629	18502
ε-CO (Δ181-185)	4462	4193	2849	18502
ε-CO (R183K)	4841	4444	2788	19165
ε-CO (S178N.R183K)	4308	3561	3126	18589
ζ1xx	4272	4614	4041	19576

表 52

第 4 天功能性表徵資料：經由 Cell Trace Violet (CTV) 染色之增殖分析 Raji、Nalm6、及 ST486 細胞系。報導的值係 CTV 分布曲線的中位數。

實驗組	Raji	Nalm6	ST486	單獨之 T 細胞
NTD	18282	18552	17666	20460
ε-CO	2778	2797	2250	19868
ε-CO (Δ181-185)	2766	2875	2235	20968
ε-CO (R183K)	2902	2935	2370	20814
ε-CO (S178N.R183K)	2548	2577	2176	21226
ζ1xx	3101	4415	2595	25142

【0328】 連續殺滅。將產物 CAR-T 細胞針對 CAR 表現進行標準化，並與抗原表現 Nalm6 目標系以 1:1 E:T 比共培養。每 3 至 4 天，用更多 Nalm6 目標細胞攻擊培養物。添加更多目標細胞之每一輪皆測量細胞毒性（表 53）及 CD3+ T 細胞計數（表 54）。在 14 輪後，構築體之間不存在顯著差異。

表 53

連續殺滅資料：六重複中 Nalm6 細胞系之細胞毒性百分比

實驗組	輪													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
NTD	13.9	0	25.6	0	14.1	0	19.8	0	3.3	0	0	0	0	0
	12	0	20.3	0	4.3	0	15.4	0	0	0	0	0	0	0
	7.1	0	23.4	0	1.4	0	12.8	0	0	0	0	0	0.2	0
	8.5	0	20	0	0.5	0	11.4	0	5	0	13.2	0	3.6	0
	5.8	0	17.8	0	5.3	0	10.6	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	9.2	0	18.5	0	7.2	0	14.4	0	2.2	0	26.4	0	6.3	0
$\zeta$ -CO	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.6	97.2	14.2	0	3.6	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	99.9	77.5	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	98.1	44.1	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.8	98.7	17.4	0	3	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	92.5	0	0	10.3	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	99.9	99.5	45.1	0	0
$\varepsilon$ -CO	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.2	92.9	0	0	2.1	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.6	91	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.9	92	0	0	1.1	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	91.9	0	0	11.2	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	93.8	0	0	15.1	0
	100	100	100	99.8	100	99.9	100.1	100.1	97.1	75.2	0	0	11.9	0
$\varepsilon$ -CO	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	98.6	94.9	0	0	3.6	0

(Δ181-185)	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.9	99.8	97.8	19.5	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.5	93.7	0	0	0	0
	100	99.9	100	100	100	100	100.1	100.1	99.9	98.1	0	0	1.7	0
	100	100	100	99.7	100	100	100.1	100.1	99.1	95	0	0	3.3	0
	100	100	100	99.9	100	100	100.1	100.1	99.8	95.7	0	0	6.1	0
ε-CO (R183K)	100	99.9	100	99.9	99.9	99.9	100	100.1	99	86.1	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	95.4	82.3	0	0	6.1	0
	99.9	100	100	100	100	100	100.1	100.1	98.9	86.7	0	0	0	0
	100	100	100	99.9	100	100	100.1	100.1	100.2	100	96.4	43.9	0	0
	99.9	100	100	99.9	100	100	100.1	100	97.7	71.4	0	0	5.2	0
	100	99.9	100	99.9	100	100	99.3	100	89.1	53.9	0	0	14.7	0
ε-CO (S178N.R183K)	100	100	100	100	100	100	100	100	97.9	89.6	0	0	0.3	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100	98.8	89.9	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100	98.2	95.7	0	0	2.6	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	98.8	86.7	0	0	11.2	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100	100.1	99.9	95.4	31.1	0	0
	100	100	100	99.9	100	99.9	100.1	100	97.2	81	0	0	13.9	0
ζ1xx	100	99.9	100	99.9	100	99.9	100.1	100.1	100.2	100	99.8	89.7	0	0
	100	99.9	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	99.6	47.4	0	0	0
	100	99.9	100	99.9	100	100	100	100.1	100.2	100	79	0	0	0
	100	99.9	100	99.9	100	100	100.1	100.1	100.1	99.7	89.6	66.8	0	0
	100	99.9	100	100	100	100	100.1	100.1	100.2	99.2	11.1	0	2.1	0
	100	99.9	100	99.9	100	99.9	100.1	100.1	100.2	100	98.1	83.6	0	0

表 54

連續殺滅資料：六重複中與 Nalm6 細胞系共培養之 CD3+ T 細胞計數

實驗組	輪												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
NTD	88	25	53	98	22	25	105	9	28	68	304	759	608
	103	6	35	43	30	6	58	41	42	51	456	456	4556
	90	30	22	65	38	16	60	23	28	101	506	152	3189
	148	13	19	73	63	13	65	33	70	101	759	608	4101
	113	28	25	63	30	22	95	28	180	68	911	0	456
	110	25	50	53	58	19	38	28	28	17	101	304	2278
ζ-CO	3200	10475	52000	39500	29500	25750	24925	14588	2531	4219	11846	2278	911
	5075	22950	57250	40000	29500	30000	41500	22163	9878	40500	3443	5164	7746
	7625	31750	59250	42250	33000	22725	35750	28088	3645	9720	8201	7290	8657
	8675	37000	48250	48000	34750	35750	43750	27938	2318	6278	4759	2278	4556
	5325	24275	47000	36250	34000	22175	30000	29025	3803	4556	962	1367	1823
	5925	24800	45500	44750	32750	23825	51750	26288	10598	82350	31590	9720	10024

ε-CO	3825	7775	24250	26000	23275	24700	19350	18825	1789	1148	1215	608	3645
	6300	10700	40000	43250	36250	25750	41500	28950	1676	439	2734	3645	2278
	7675	14325	58750	52000	46000	29250	41500	23850	2104	405	2025	2582	2734
	7850	12150	62500	34000	35250	24825	23975	28613	1373	4556	1215	608	1367
	6850	9175	19925	47500	35500	32250	24150	28688	2689	2599	6075	2886	2278
	5700	7275	19400	35000	18025	29000	28000	13538	349	439	1721	1367	911
ε-CO (Δ181-185)	6925	26250	26500	22850	21425	19400	19725	12263	2070	2261	3038	1671	4556
	9200	34000	26250	22350	34250	19200	22100	15600	8595	76275	4455	2582	3189
	11150	32750	35250	15100	26750	32750	19775	13050	923	1890	2025	1367	2278
	12400	38750	33500	13025	35500	25500	19225	16088	2711	7324	1418	759	2278
	11375	34000	17625	16175	32750	32000	23025	14325	1598	979	5063	1215	3645
	7900	26750	20800	17675	32750	24875	21500	13913	585	608	456	456	911
ε-CO (R183K)	3175	3250	7700	4225	38250	7000	12050	14250	878	945	1114	1519	2734
	4975	4850	18375	26750	32500	17200	15075	9900	765	675	810	911	911
	5225	9725	33000	26250	33000	18300	17200	14325	641	945	2025	1367	3645
	8975	9400	39750	37750	21125	19025	22475	27300	15638	74925	13365	10328	8201
	5275	4625	28500	20475	27250	21125	34500	14363	259	574	1114	1671	4556
	4525	7325	27500	26250	31750	31000	198	4875	169	709	557	759	3189

$\varepsilon$ -CO (S178N.R183K)	9000	23525	28250	18250	27250	27500	26000	9788	1069	1485	2430	1215	2734
	13075	36500	20100	16800	35750	19950	21125	14850	1766	1384	1823	1823	2734
	16875	44250	16250	18500	33500	32500	38000	11363	2723	19305	11036	3645	3645
	18575	42750	22500	10225	35250	45500	33500	21225	698	878	2025	3341	1367
	13400	38750	23550	17750	41000	21175	26000	33225	28013	92138	35438	20959	4101
	9725	36000	27500	21500	29250	34750	34000	15375	405	270	810	456	456
$\zeta$ 1xx	4850	4475	20450	28000	40750	30000	34000	38625	33413	102600	112388	61965	6379
	7225	9700	34500	29000	24950	25500	73500	36413	9698	14546	6176	20351	4101
	8375	14725	46250	32500	31250	41000	38000	41250	15075	30848	5974	14884	7746
	7850	20700	42750	33000	30000	42500	64000	32025	11183	39150	34223	60750	30071
	6525	8425	40750	35250	45500	25500	48000	26438	7740	6008	7088	1974	456
	6625	8250	26750	44000	26750	23850	74250	62250	60525	96188	22984	12758	30983

## 實例11

【0329】 如本文所述，評估其他含ITAM之蛋白質，其可替換CD3  $\zeta$ 作為抗CD19第二代嵌合抗原受體(CAR)中之信號傳導域，且增強CAR T細胞產物之治療潛力。設計了5個新的第二代CAR構築體，其等利用五種新穎信號傳導域中之一者，包括CD3  $\epsilon$ 、CD3  $\delta$ 、CD3  $\gamma$ 、及Dap12，作為基準抗CD19對照CAR中CD3  $\zeta$ 之替代物。所有皆成功轉導且在初級人類T細胞中表現。此等新的CAR構築體透過體外檢定表徵，且顯示相當的CAR T細胞功能。體內研究表明，當與CD3  $\zeta$ 基準對照相比時， $\epsilon$ -CO構築體具有優越腫瘤控制、CAR擴增、及持久性，證實利用CD3  $\epsilon$ 信號傳導域之抗CD19 CAR在體內具有增強之功效。此處顯示，相較於具有CD3  $\zeta$ 信號傳導域之基準抗CD19對照CAR，利用CD3  $\epsilon$ 、Dap12、CD3  $\delta$ 、或CD3  $\gamma$ 信號傳導域之抗CD19 CAR證實了顯著改善的體內腫瘤控制。

【0330】 構築體設計。抗CD19第二代嵌合抗原受體(CAR)，以下稱為  $\zeta$ ，具有序列

```
ATGGCTCTGCCTGTGACCGCTCTGCTGTTGCCCTTGCTTTACTCCTGCAC
GCCGCAAGACCCGACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGC
CTCCCTTGGAGACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTC
CAAGTACTTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTG
CTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCCTCAAGATTCTCC
GGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCA
AGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACA
CCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATC
```

TGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCT  
GCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCCTGAGCGTTA  
CATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCTTCCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCC  
GCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAG  
CGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCA  
AGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGAAGATGAACTCTCTCAAACC  
GACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAG  
CTACGCTATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTG  
CCGCCGCTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAA  
GGGAAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTT  
CTGGGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTG  
TGACCGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTG  
CTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCA  
GAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGA  
AGCAGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGG  
CCAAAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATAC  
GACGTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAG  
CCAAGAAGAAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAAAGG  
ACAAGATGGCTGAGGCTTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAG  
AAGAGGAAAGGGACACGACGGACTGTACCAAGGCCTGAGCACCGCTACC  
AAGGACACCTACGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ  
ID NO: 91)作為親本模板，以進行工程改造且合成七個子構築體。此等構築體  
以下稱為 $\zeta$  1xx、 $\varepsilon$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、Dap12、 $\zeta$ -CO、及 $\varepsilon$ -CO。為產生子構築體，親本模  
板核酸3316至3651之CD3 $\zeta$ 信號傳導蛋白係經以下序列置換（參見圖3）；

ζ<sub>1xx</sub> :

CGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCA  
AAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGAC  
GTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCA  
AGAAGAAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTTTAAACGAGCTGCAAAAGGACA  
AGATGGCTGAGGCTTTCTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAG  
AGGAAAGGGACACGACGGACTGTTCCAAGGCCTGAGCACCGCTACCAAG  
GACACCTTCGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO:  
82)

ε :

AAGAACCGGAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACAAGAGGTGCTGGTGCTG  
GCGGCAGACAGAGAGGCCAGAACAAAGAAAGACCTCCTCCTGTGCCTAA  
TCCTGACTACGAGCCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACAGCGGC  
CTGAACCAGCGGCGGATT (SEQ ID NO: 53)

δ :

GGACACGAAACAGGCAGACTTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCT  
GAGAAACGACCAGGTGTACCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCAG  
TACTCTCACCTCGGCGGCAATTGGGCCAGAAACAAG (SEQ ID NO: 83)

γ :

GGACAGGATGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCCTGC  
TGCCTAACGACCAGCTGTACCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCA  
GTACAGCCATCTGCAGGGCAACCAGCTGCGGAGAAAC (SEQ ID NO: 84)

Dap12 :

TACTTCCTGGGCAGACTGGTGCCTAGAGGAAGAGGAGCTGCTGAGGCTGC  
TACCAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACCGAGAGCCCTTACCAGGAGCTG  
CAGGGACAGAGAAGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGAGACCTT  
ACTACAAG (SEQ ID NO: 85)

ζ-CO :

AGAGTTAAGTTCAGCAGGAGCGCCGACGCACCTGCCTACCAaCAAGGGCA  
GAATCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAGGAATACGAT  
GTGCTGGACAAGAGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCTA  
GAAGAAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAATGAGCTCCAGAAGGATAA  
GATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAAAGAAGAAG  
AGGCAAGGGCCACGACGGCCTCTACCAGGGCTTAAGCACAGCTACTAAG  
GACACCTACGACGCCCTGCACATGCAAGCTCTGCCCCCTAGA (SEQ ID NO:  
86)

ε-CO :

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCA  
GGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAA

ATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGT  
CTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO: 54)

【0331】 CAR T細胞產物之製造。自健康人類捐贈者之分離材料係經洗滌，以抗CD8抗體連結之磁珠培養，且按製造商之說明書使用CliniMACS細胞分離系統(Miltenyi Biotech)加工，以富集CD8+ T細胞，其隨後被冷凍保存。將所得陰性流份洗滌，且如上所描述使用抗CD4抗體連結磁珠來處理，以富集CD4+ T細胞，其隨後被冷凍保存。經分離之CD4+及CD8+初級人類T細胞在OpTmizer CTS™ T細胞擴增基礎培養基中解凍，該培養基補充有2.6% OpTmizer CTS™ T細胞擴增補充品、2.5% CTS免疫細胞血清替代品、1%青黴素/鏈黴素/L-麩醯胺酸、及305個國際單位/mL人類介白素(IL)-2，此後稱為完全OpTmizer™培養基。將T細胞以 $1.5 \times 10^6$ 個細胞/mL之密度再懸浮於含有1.66  $\mu\text{g/mL}$ 抗CD28抗體（殖株28.2）之OpTmizer™培養基中，且接著接種至預塗有1.23  $\mu\text{g/mL}$ 抗CD3抗體（殖株OKT3）之T-75培養瓶以誘導T細胞活化（第0天）。在活化後第1天，細胞係由編碼親本抗CD19 CAR之LVV轉導，或以20之MOI由子構築體 $\epsilon$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、及Dap12轉導。由 $\zeta\text{CO}$ 及 $\epsilon\text{CO}$ 構築體所組成之額外實驗組以5之MOI轉導，且非轉導(NTD)樣本作為陰性對照。在第3天將T細胞以完全OpTmizer™培養基洗滌，標準化並額外擴增4天（第3天至第7天）。在收集時間點（第7天），細胞係經冷凍保存以供未來使用。在擴增期間（第3天至第7天）之多個時間點，使用Vi-CELL進行細胞計數，且藉由添加完全OpTmizer™培養基將細胞密度標準化至0.5至 $1 \times 10^6$ 個細胞/mL。在此等時間點，將平均細胞存活率、直徑、及細胞密度記錄在Vi-CELL上。

【0332】 在第6天及第7天藉由流動式細胞測量術測量CAR表現。T細胞用一組螢光團接合抗體染色，且藉由流動式細胞測量術表徵，以判定轉導效率及CD4+/CD8+ T細胞比。CAR表現（抗CD19 CAR）之評估藉由螢光團接合KIP-1進行。可固定細胞存活率染料允許對活細胞之特定分析。藉由與適當抗體混合在4 °C下培養20分鐘來染色細胞，隨後用染色緩衝液進行2次洗滌，且隨後藉由在室溫下於0.6%多聚甲醛（於磷酸緩衝鹽水或漢克平衡鹽溶液中）中培養10分鐘來固定。在FACS Canto儀器上收集所有流動式細胞測量術資料，並使用FlowJo軟體分析資料。

【0333】 第0天共培養設置。在收集日（製造第7天）冷凍保存自衍生自健康捐贈者血球之T細胞所製造之T細胞產物。隨後，在與目標細胞開始共培養之前，T細胞產物在完全OpTmizer™培養基中解凍並靜置隔夜。在開始共培養之前，將各T細胞樣本之等分試樣與一組抗體-螢光團一起培養，且藉由流動式細胞測量術分析以評估轉導效率。使用KIP-1客製抗體評估總轉導效率，該客製抗體結合單鏈可變片段(scFv)之重鏈及輕鏈之間的惠特洛連接子。用CellTrace™ Violet (CTV)試劑標記T細胞，且隨後用R-10%培養基[RPMI-1640培養基，補充有10%胎牛血清、青黴素鏈黴素、L-麩醯胺酸、及HEPES]洗滌。將CTV標記之樣本之部分固定，且儲存在4°C下直至第4天，當樣本藉由流動式細胞測量術與第4天之共培養樣本同時分析，以評估CTV信號之初始水平（CTV最大值）。在R-10%培養基中（共培養第0天），將T細胞產物及表現螢光素酶之目標細胞以不同的反應物對目標(E:T)比（在3:1至1:243之範圍中）接種在一起。將T細胞產物連續稀釋3倍，而每孔之目標細胞數目保持恆定於20,000個細胞。陽性目標細胞包括Nalm6 (CD19+)及ST486 (CD19+)。作為對照，在不存在

任何目標細胞（亦即，單獨之T細胞）下培養T細胞產物，以評估在不存在抗原刺激下T細胞功能之基礎水平。在37°C下培養共培養物1或4天，且如下文所述般進行功能評估。

**【0334】** 第1天細胞毒性。T細胞介導之細胞毒性係依據以下來測量：相較於單獨接種目標細胞所發射之信號，共培養孔中目標螢光素酶信號之降低。共培養起始後第1天及第4天，以0.14 mg/mL之最終濃度將D-螢光素受質添加至共培養孔中，且培養盤於37°C下在暗處培養10分鐘。之後立即在VarioSkan™ LUX或VarioSkan® Flash多模微量盤讀取儀中讀取螢光信號。T細胞介導之細胞毒性係計算如下：

細胞毒性%=[1-（關注樣本/單獨目標對照）之螢光素酶信號]\*100。

**【0335】** 第1天細胞介素產生。在共培養起始後的第1天，收集上清液並根據製造商之指示使用Meso Scale Discovery V-PLEX促炎性板1人類套組來分析細胞介素水平。具體而言，來自T細胞產物之共培養物之上清液（以1:1的E:T比接種，具有表現抗原Nalm6及ST486）係針對干擾素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IL-2、及腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )由抗原接合所介導之分泌的水平進行分析。同時分析來自不存在目標細胞（單獨之T細胞）下培養之T細胞之上清液，以評估不存在抗原下細胞介素產生之基礎水平。將所有樣本稀釋至偵測範圍內。

**【0336】** 第4天增殖。在共培養起始後第4天，收集以1:1之E:T比與目標細胞接種之T細胞產物，以抗體-螢光團板染色以識別T細胞，且藉由流動式細胞測量術分析。T細胞產物之增殖能力係藉由流動式細胞測量術分析以下來判

定：將CTV染料之細胞分裂驅動稀釋對抗原表現目標細胞的反應，相較於對已經單獨培養之T細胞產物（單獨之T細胞）的反應，該單獨之T細胞係用以評估在不存在刺激下穩態增殖之基礎水平。藉由流動式細胞測量術同時分析在共培養設置（CTV最大值）當天固定之CTV標記T細胞，以評估在細胞增殖之前初始CTV信號之強度。

【0337】 體內研究（劑量1 –劑量2 –劑量3）。製備抗CD19產物CAR T細胞及NTD細胞，且將冷凍小瓶中之冷凍細胞在乾冰上運送。收到後，將冷凍小瓶儲存在液氮中。注射前一天，將小瓶自冷凍器移除，在37°C水浴中解凍，且將細胞再懸浮於預溫熱、含有305個國際單位(IU)/mL介白素(IL)-2之完全OpTmizer™培養基中。將細胞懸浮液在400 ×g下在室溫下離心5分鐘，且吸取上清液並棄去。接著將細胞團塊再懸浮於完全OpTmizer™培養基及305個IU/mL IL-2中，且使用Vi-CELL BLU自動化細胞計數器藉由台盼藍染料排除方法來分析細胞懸浮液之等分試樣的細胞計數及存活率。接著將細胞以2.0至5.0 × 10<sup>6</sup>個細胞/mL再懸浮於完全OpTmizer™培養基及305個IU/mL IL-2中，轉移到培養瓶中且在37°C/5% CO<sub>2</sub>培養箱中培養隔夜。在注射當天，再懸浮細胞之後，使用Vi-cell BLU自動細胞計數器計算各條件之等分試樣，以判定細胞濃度及細胞之注射前存活率。隨後將細胞懸浮液以400 × g在4°C下離心5分鐘。抽吸上清液且丟棄，且將細胞團塊再懸浮於冷PBS中。研究之後，測試不同的CAR T細胞劑量：

對於劑量1：每組1劑1.0 x 10<sup>7</sup>個CAR<sup>+</sup>細胞，

對於劑量2：每組1劑2.0 x 10<sup>6</sup>個CAR<sup>+</sup>細胞，

對於劑量3：每組3劑CAR<sup>+</sup>細胞：1.0 x 10<sup>6</sup>個、2.0 x 10<sup>5</sup>個、或4.0 x 10<sup>4</sup>個。

【0338】 治療組及劑量標準化。對於各項研究，在各治療組之小鼠中皆投予相同數目之T細胞。將投予至各治療組之劑量經標準化，以基於抗CD19 CAR轉導效率對各組遞送相同總數之T細胞。

【0339】 體內生物發光影像。使用IVIS Lumina S5光學影像系統 (Xenogen, Alameda, CA)進行體內BLI。一次對五隻動物在大約1%至2%之異氟烷氣體麻醉下照相。將各小鼠腹膜內(IP)注射150 mg/kg D-螢光素，並在注射之後15分鐘以俯臥位照相。使用電荷耦合元件(CCD)晶片之中等像素合併 (binning)，並調整曝光時間（2秒至2分鐘），以自影像中各小鼠中可觀察到的播散性腫瘤獲得至少數百個計數並避免CCD晶片之飽和。每週收集BLI影像兩次。使用Living Image軟體版本4.7.3 (Xenogen, Alameda, CA)分析影像。將全身固定體積關注區域(regions of interest, ROI)置於各個別動物之俯臥影像上並基於動物識別進行標示。針對所有ROI計算總通量（光子/秒）並匯出。

【0340】 體外ddPCR及流動式細胞測量術分析。經由EDTA塗佈之管中之眼窩靜脈竇每週收集100  $\mu$ L之血液體積，且將其直接冷凍以用於後續ddPCR分析或藉由流動式細胞測量術分析。在T細胞注射後24小時開始對動物取樣，並在研究期間持續每週取樣。對於ddPCR，按製造商之指示使用KingFisher™ Flex（小體積）自全血中進行基因體DNA純化，接著經由內部Kite程序、及Bio-Rad儀器在純化DNA上執行ddPCR。對於流動式細胞測量術分析，按照內部Kite方案使用螢光團接合抗體對全血進行染色，且接著在流動式細胞儀上分析。使用用於流動式細胞測量術之CountBright™ Absolute Counting Bead獲得血液中之絕對細胞計數。

【0341】 體內研究（劑量1）。此研究評估體內潛在的非抗原依賴性T細胞擴增及持續存在之CAR T細胞之功能性。與治療開始時之初始值相比，各種時間點之體重變化總結於表62中。所有組之小鼠皆隨著時間而體重增加，直至第49天與無毒性一致。在第49天，將各組之4隻小鼠（ $\epsilon$ -CO組除外）安樂死以用於離體分析，及在第50天，將各組之其他4隻小鼠植入Nalm6-luc MHC I/II DKO腫瘤細胞（ $5.0 \times 10^5$ 於100  $\mu$ L靜脈內(IV)），並記錄所有剩餘小鼠之體重變化，直至第85天研究結束。自第50天至第85天， $\epsilon$ -CO組之小鼠顯示體重增加直至研究結束為止，但當小鼠在第70天達到研究終點時，來自媒劑、NTD、及 $\zeta$ -CO組之小鼠與腫瘤負荷相關之體重變化減少。

【0342】 透過在各種時間點之BLI測量評估腫瘤負荷（表63）。各實驗組之生物發光影像(BLI)總結於表63中。在第0天接受NTD細胞或 $\zeta$ -CO CAR T細胞之媒劑對照組或組顯示無腫瘤控制，且在T細胞輸注後第70天（腫瘤細胞植入後第20天）由於高腫瘤負荷而被安樂死。僅 $\epsilon$ -CO組在第85天（腫瘤細胞植入後第35天）研究終止之前顯示無腫瘤生長，證實 $\epsilon$ -CO CAR T細胞在不存在抗原之情況下持續存在且維持其抗腫瘤效力達50天，且在之後有效地清除腫瘤負荷，相較於 $\zeta$  CO基準對照，顯著改善了腫瘤控制。

表62

T 細胞輸注後天數	媒劑								NTD							
5	-3.2	-5.5	4	0.5	2.1	3.5	-8.1	2.1	2.7	2.7	0.5	0.5	4.2	2.5	2	3.3
8	4.9	2.5	2	1.4	4.7	0.5	-4.5	3.2	3.2	3.2	0.5	-1	4.2	2	-1	1.6
11	12.4	0.5	6.5	3.8	6.8	2.5	-2	8.5	5.9	6.5	3.6	6.2	7.3	5	5.4	4.3
13	13	5.5	6	4.3	9.5	1	-2	9.6	5	7.5	3.6	5.2	9.4	5	6.4	4.9
15	11.9	9	9.5	4.3	9.5	7.1	16.2	13.8	6.4	10.8	5.9	8.8	9.9	7	7.8	9.2
22	11.4	12.6	10.1	13.5	15.3	15.2	3	18.6	7.8	12.9	10.4	13.5	9.9	13.6	12.7	21.7
27	11.9	10.1	10.1	11.5	17.9	-1	9.6	13.8	8.2	13.4	9	10.9	14.7	11.1	11.3	21.7
29	16.8	11.6	12.6	15.9	21.6	14.1	5.6	19.1	12.3	16.1	14	16.6	13.1	13.1	11.3	25
33	13.5	12.6	12.1	14.9	22.6	10.1	6.1	18.6	13.7	15.6	11.7	17.6	13.1	13.1	11.3	16.8
36	14.1	13.1	10.6	13.9	22.6	11.1	7.1	19.7	13.2	15.1	12.2	16.6	12	13.1	9.8	16.8
42	11.4	15.6	16.1	13.5	23.7	13.6	10.1	21.3	16.9	18.3	15.3	18.7	18.3	15.6	13.2	14.1
48	20	15.6	15.1	20.2	25.3	14.1	6.1	19.1	14.2	18.8	11.3	20.7	17.8	13.6	13.2	14.1
56					28.4	21.2	5.6	22.3					15.7	15.6	17.6	16.8
64					26.8	22.7	5.6	19.7					15.2	15.6	12.7	19.6
70					23.7	16.2	3	17					13.6	12.6	15.2	16.8
80																
85																

表62 (續)

$\zeta$ -CO								$\varepsilon$ -CO							
-5.7	-2.5	1.6	-4	0	2	-1	0	-6.1	-3.1	-2	0	-4.3	1.9	2	6.9
3.1	-0.5	8.6	0.5	2.5	-11.6	-10	-12.6	0.4	-1	-1.9	-1	1.2	0.5	-4	6.5
-4.1	-0.5	10.2	2.5	3.5	-10.6	-0.5	-1.5	4	2.5	2.4	1	7.1	6.4	5.5	12.9
-1.6	0.5	10.8	2	9.1	-7	-3	2.5	6.2	2.5	2.9	2	10	5.4	4	13.9
4.7	0.5	10.2	6	14.1	4	3	7.6	7.5	3	2.9	6.1	11.2	8.4	6.5	17.4
11.4	1	19.9	11.6	16.2	9	5	12.1	14.1	7.6	7.7	7.6	17.1	12.3	11.9	20.9
7.3	-2	18.8	4.5	15.7	14.6	9.5	8.1	12.3	10.1	8.7	12.6	15.3	11.8	12.4	24.4
11.9	3.5	22	8	17.2	14.1	8.5	16.7	13.7	11.6	9.2	14.6	22.4	13.8	13.9	11.9
6.7	3.5	17.2	9	14.6	13.6	6.5	17.7	13.2	13.1	10.1	12.1	22.9	14.3	13.4	11.9
4.7	4	15.6	8	15.7	14.1	5	18.7	12.3	14.1	8.2	13.1	27.1	16.3	12.9	14.4
10.9	6	16.1	12.1	18.2	14.6	6.5	22.7	14.5	16.2	9.2	9.1	25.3	15.8	13.9	20.9
8.3	5.5	17.2	11.1	20.2	8.5	8.5	22.7	18.5	12.6	13	11.6	26.5	16.3	15.4	6.5
				12.1	13.6	11	21.2	21.1	16.2	15.5	21.7	27.6	25.1	21.9	11.9
				7.1	10.6	7	12.6	19.8	12.1	15.5	16.7	31.2	18.7	9.5	15.4
				7.6	11.1	6.5	14.6	18.9	11.1	16.4	16.2	32.4	21.2	9.5	14.4
								18.5	13.6	15.0	18.2	34.7	25.6	11.9	20.9
								19.8	12.6	14.0	16.2	35.9	26.6	12.9	22.4

表63

T 細胞輸注後天數	媒劑				NTD			
56	1.64E+06	1.64E+06	1.39E+06	1.92E+06	1.67E+06	1.53E+06	1.29E+06	1.02E+06
60	3.08E+07	4.13E+07	2.87E+07	1.85E+07	3.86E+07	2.04E+07	2.29E+07	3.55E+07
67	7.01E+09	6.49E+09	5.63E+09	9.02E+09	4.68E+09	6.05E+09	6.97E+09	6.53E+09
70	1.56E+10	2.06E+10	9.75E+09	1.65E+10	1.80E+10	1.41E+10	1.15E+10	1.32E+10
81								
85								

表63 (續)

$\zeta$ -CO				$\varepsilon$ -CO			
1.57E+06	1.72E+06	1.19E+06	1.22E+06	7.20E+05	7.64E+05	9.01E+05	7.34E+05
2.12E+07	8.97E+06	2.17E+07	2.80E+07	8.50E+05	8.22E+05	7.74E+05	9.29E+05
3.36E+09	4.02E+09	5.87E+09	3.91E+09	7.29E+05	7.71E+05	6.80E+05	6.34E+05
1.25E+10	1.09E+10	1.29E+10	1.13E+10	7.38E+05	8.04E+05	8.00E+05	5.38E+05
				6.50E+05	7.19E+05	6.75E+05	5.52E+05
				6.84E+05	6.51E+05	6.59E+05	7.65E+05

【0343】 離體流動式細胞測量術分析。為了評估體內CAR T細胞擴增及持久性，經由流動式細胞測量術分析周邊血液隨時間變化之CD3<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup>細胞數/ $\mu$ L血液（表64）。 $\zeta$ -CO組在小鼠之周邊血液中沒有展現出CAR T細胞擴增，因為CD3<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup>細胞在第20天後穩定降低至 $< 1$ 個細胞/ $\mu$ L。然而， $\varepsilon$ -CO組展現出持續的CAR T細胞持久性直至第62天至第76天，之後4隻小鼠中有3隻開始顯示血液中之CAR T細胞數目下降（表64）。

表64

T 細胞輸注後天數	G1.媒劑								G2.NTD							
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			0.347	0.175	0.825	0.000	0.114	0.000	0.120	0.369
13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.170	0.109	0.373	0.000	0.420	0.086	0.144	0.354
20	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.385	0.000	0.274	0.204	0.000	0.126
27	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.131	0.000	0.000	0.184
34	0.000		0.000	0.000		0.000		0.000	0.000	0.000		0.467		0.261		0.403
48						0.000	0.000	0.000	0.094	0.000			0.000			0.000
62																
76																
90																

表64 (續)

G3.ζ-CO								G4.ε-CO							
35.534	17.402	28.549	20.086	22.085	27.287	22.490	19.594	23.241	42.539	36.782	30.664		50.756	46.322	29.184
23.963	4.346	2.759	6.972	3.752	10.656	9.974	11.073	18.441	39.762	27.582	13.122		13.798	21.930	24.618
5.220	1.600	0.806	1.922	0.503	2.251	3.056	2.893	15.903	12.763	7.976			9.984	28.934	7.763
0.450	0.716	0.613	0.405	1.342	0.164	0.131	0.191	21.538	14.389	37.939	47.398		59.796	40.141	45.476
0.124	0.225			0.140				14.514	21.238	12.328	16.891		152.486	20.150	50.277
			0.000				0.000	20.212	52.309	24.140	11.335		19.689	10.574	22.921

								17.946	44.988	21.224	6.286				
								17.039	13.121	32.051	6.270				
								6.683	1.744	16.380	22.514				

【0344】 體內研究（劑量2）。此研究評估 $\epsilon$ -CO CAR T細胞在Nalm6 MHC I/II DKO細胞多次腫瘤再攻擊(rechallenge)後之持久性及抗腫瘤功效。與治療開始時之初始值相比，各種時間點之體重變化總結於表65中。所有CAR T細胞皆具有良好耐受性，動物在研究時間保持一致體重。各實驗組之BLI總結於表66中。媒劑與NTD組顯示無腫瘤控制，且由於高腫瘤負荷而在第21天被安樂死。 $\zeta$ -CO組在第0天進行1次初始腫瘤植入後，或在第21天、第28天、第35天、及第42天用Nalm6 MHC I/II DKO進行4次後續腫瘤再攻擊後，顯示出相當的療效：腫瘤控制至第20天，隨後由於高腫瘤負荷，腫瘤復發直至第47天實施安樂死。相比之下， $\epsilon$ -CO組在第0天1次初始腫瘤植入後，或在第21天、第28天、第35天、第42天、及第63天用Nalm6 MHC I/II DKO進行5次後續腫瘤再攻擊後，維持完全腫瘤清除直至第84天研究終止，證實相較於 $\zeta$  CO基準對照，此等細胞顯著改善腫瘤控制。

表65

腫瘤接種後天數	媒劑					NTD					ζ-CO				
7	1.9	1.9	2	3.5	1	1.7	1.4	1.3	4.8	-0.5	1.5	-0.9	0.5	0	1
11	3.7	4.8	7.6	8.9	-1.9	8.7	11.8	2.2	8.7	3.9	2	-6.5	7	4.9	2.5
14	8.4	5.2	10.6	9.4	0	5.7	9.1	0	8.7	4.3	0.5	-4.1	8	7.4	15.2
18	7	8.1	12.6	11.4	-3.4	-3.9	4.5	-0.4	8.2	4.8	4.4	-2.3	10.4	10.3	15.7
21											2.9	1.8	9.5	8.4	7.6
24											7.3	0.5	14.9	13.3	18.2
28											7.3	0.5	14.9	13.3	18.2
32											6.8	0	13.4	13.3	15.2
35											6.3	-0.9	14.4	13.3	13.6
41											6.3	4.1	10.9	9.9	19.7
47											7.3	2.3	7	13.8	5.1
55															
67															
77															
84															

表65 (續)

ε-CO					ζ-CO 腫瘤再攻擊									ε-CO 腫瘤再攻擊								
-7.8	5.2	4.4	2.4	-0.4	2	-2.9	-5.9	-10.2	-1.9	4.3	1	-5.6	2	0.9	-5.5	-0.9	8.3	0.5	-1	1	-6.8	0.4
-1.3	10.3	9.2	8.2	4	20.7	1	0.5	-7.1	6.1	2.9	12.6	-4.2	1	3.3	-3.7	-1.8	11.5	-3.9	3.8	4.9	5.1	1.7
0.4	13.4	9.7	9.7	4.8	21.7	2.9	7.9	-5.3	8.5	7.2	17.8	0	7.9	9.4	-5.1	-4.1	16.1	-1.5	6.7	8.3	6.8	0.9
5.2	19.6	12.6	8.2	4	19.7	6.3	4.4	-5.3	10.8	12.6	20.9	0.5	10.4	11.7	-4.1	-2.3	13.8	0	3.8	9.7	10.7	1.3
-1.3	17.5	11.7	9.2	2.6	22.2	4.8	4.9	-3.1	9.9	6.8	19.4	-3.7	11.4	9.9	-3.7	-6	11.5	1	4.3	7.8	11.1	0
-1.3	19.6	15.5	15	5.7	27.3	10.1	9.4	-1.3	14.6	9.7	23.6	2.8	16.3	13.1	-0.9	-1.4	12.4	26.6	1.9	9.2	-2.1	7.7
-1.3	19.6	15.5	15	5.7	27.3	10.1	9.4	-1.3	14.6	9.7	23.6	2.8	16.3	13.1	-0.9	-1.4	12.4	26.6	1.9	9.2	-2.1	7.7
-1.3	17	18	14	4	22.2	8.2	5.9	-0.9	11.8	6.3	20.4	-2.8	11.9	12.2	-4.1	-4.1	11.5	21.7	-1.9	8.3	-5.1	4.7
-2.2	15.5	17	14.5	4.8	22.7	8.7	6.4	-0.4	11.3	6.3	21.5	-2.8	12.9	12.7	-3.2	-3.7	12.4	20.2	-1.9	9.2	-3	3.8
-4.3	17	17.5	13	4.4	21.7	10.1	5.4	1.8	9.9	5.8	22.5	-6.9	13.9	13.1	-1.4	-0.5	12.8	23.6	0.5	9.7	-6	9.4
-5.7	14.9	16	9.7	1.3	12	3.9	-0.9	6.1	4.3	22.5	-8.8	12.4	12.2	0.5	0.9	13.8	23.6	5.8	8.3	-7.7	8.9	
1.3	20.6	18	18.4	2.6										13.6	4.1	3.7	23.9	28.1	6.3	10.7	-2.6	14.9
-5.7	13.4	11.7	10.6	1.3										10.3	1.4	1.4	14.7	22.7	6.7	8.3	-6	9.8
-5.7	14.9	16	9.7	1.3										12.2	0.5	0.9	13.8	23.6	5.8	8.3	-7.7	8.9
-4.3	16	18	11.1	1.8										12.2	1.4	1.4	13.8	23.2	7.2	7.8	-7.3	9.4

表66

腫瘤接種後天數	媒劑					NTD				
7	2.32E+06	1.97E+06	3.44E+06	2.18E+06	3.01E+06	2.68E+06	1.95E+06	2.18E+06	2.50E+06	1.61E+06
11	2.78E+08	1.58E+08	1.20E+08	2.25E+08	2.66E+08	3.42E+08	4.07E+08	2.05E+08	2.56E+08	1.46E+08
14	2.67E+09	1.09E+09	2.96E+09	2.57E+09	2.55E+09	1.68E+09	2.27E+09	7.29E+09	1.94E+09	1.52E+09
18	1.28E+10	9.95E+09	1.20E+10	1.27E+10	1.02E+10	1.04E+10	1.09E+10	1.08E+10	1.15E+10	1.01E+10
21	2.04E+10	1.61E+10	2.74E+10	1.79E+10	1.68E+10	1.08E+10	2.08E+10	2.17E+10	2.14E+10	1.38E+10
24										
28										
32										
35										
42										
47										
53										
59										
63										
67										
79										
84										

表66 (續1)

$\zeta$ -CO					$\varepsilon$ -CO				
1.96E+06	2.01E+06	2.22E+06	2.05E+06	2.14E+06	1.51E+06	1.19E+06	1.47E+06	1.65E+06	1.70E+06
6.47E+05	7.03E+05	6.01E+05	6.09E+05	6.69E+05	6.75E+05	8.17E+05	7.74E+05	8.26E+05	6.95E+05
7.75E+05	9.77E+05	7.36E+05	9.10E+05	7.98E+05	7.23E+05	7.31E+05	8.45E+05	7.31E+05	7.21E+05
8.23E+05	8.35E+05	8.70E+05	8.36E+05	2.47E+06	8.58E+05	6.55E+05	7.95E+05	8.33E+05	8.11E+05
8.07E+05	7.83E+05	9.87E+05	8.89E+05	3.86E+06	8.29E+05	9.84E+05	8.56E+05	8.59E+05	7.72E+05
7.90E+05	8.21E+05	8.11E+05	1.28E+06	1.46E+07	7.12E+05	5.54E+05	6.01E+05	8.23E+05	6.39E+05
1.25E+06	1.49E+06	1.24E+06	3.40E+06	5.80E+06	1.01E+06	1.12E+06	1.01E+06	1.13E+06	9.30E+05
1.02E+06	1.12E+06	1.09E+06	2.49E+07	1.18E+06	7.05E+05	7.67E+05	7.52E+05	7.99E+05	7.23E+05
1.67E+06	2.01E+06	4.60E+06	2.52E+08	4.62E+06	1.20E+06	1.19E+06	1.21E+06	1.34E+06	1.37E+06
1.11E+08	6.48E+07	6.33E+09	1.25E+08	9.50E+07	6.40E+05	6.38E+05	7.19E+05	6.33E+05	5.45E+05
6.82E+08	2.24E+08	1.17E+10	2.85E+08	9.46E+08	8.46E+05	7.80E+05	7.05E+05	8.30E+05	6.76E+05
					6.79E+05	7.08E+05	6.65E+05	7.23E+05	7.11E+05
					7.49E+05	8.27E+05	6.95E+05	7.23E+05	6.88E+05
					8.26E+05	6.99E+05	6.21E+05	7.14E+05	8.91E+05
					6.91E+05	7.00E+05	6.03E+05	6.93E+05	7.09E+05
					5.39E+05	6.46E+05	6.12E+05	6.20E+05	7.07E+05
					6.83E+05	7.87E+05	8.06E+05	6.31E+05	8.41E+05

表66 (續2)

ζ-CO 腫瘤再攻擊								
1.38E+06	1.09E+06	1.10E+06	1.86E+06	1.26E+06	1.49E+06	1.50E+06	1.36E+06	1.63E+06
6.08E+05	7.81E+05	6.04E+05	6.69E+05	7.97E+05	9.92E+05	7.97E+05	7.15E+05	7.86E+05
7.18E+05	8.09E+05	6.37E+05	7.69E+05	7.53E+05	7.68E+05	8.39E+05	8.81E+05	7.98E+05
8.09E+05	7.84E+05	9.42E+05	7.47E+05	8.69E+05	9.00E+05	8.83E+05	9.36E+05	8.92E+05
6.91E+05	7.46E+05	8.45E+05	7.71E+05	8.40E+05	7.61E+05	7.63E+05	7.45E+05	8.03E+05
1.00E+06	1.04E+06	9.41E+05	1.44E+06	9.49E+05	1.79E+06	2.01E+06	2.04E+06	1.11E+06
6.32E+06	2.89E+06	7.90E+06	2.52E+06	2.96E+06	8.77E+06	1.27E+07	1.27E+07	4.34E+06
1.23E+08	1.36E+07	5.57E+07	2.44E+06	5.30E+06	3.20E+07	1.22E+08	2.34E+08	1.01E+08
1.12E+09	9.57E+07	7.82E+06	2.39E+08	3.82E+07	6.63E+07	4.75E+08	1.32E+09	5.65E+08
4.30E+09	1.57E+09	8.46E+07	1.31E+09	6.78E+08	6.00E+08	1.09E+09	1.10E+10	5.67E+09
6.23E+09	1.06E+10	5.04E+08	3.73E+09	3.04E+09	1.47E+09	1.54E+10	1.79E+09	9.18E+09

表66 (續3)

ε-CO 腫瘤再攻擊								
1.95E+06	1.56E+06	2.00E+06	1.54E+06	2.87E+06	2.06E+06	1.63E+06	1.93E+06	1.34E+06
8.37E+05	7.06E+05	7.10E+05	7.33E+05	6.03E+05	7.35E+05	5.81E+05	7.59E+05	5.87E+05
7.20E+05	6.55E+05	7.16E+05	7.59E+05	8.19E+05	7.93E+05	9.69E+05	9.20E+05	6.51E+05
7.19E+05	7.11E+05	8.77E+05	7.51E+05	7.80E+05	7.33E+05	7.57E+05	7.52E+05	5.94E+05
7.95E+05	7.29E+05	7.10E+05	8.54E+05	9.77E+05	7.81E+05	6.91E+05	8.38E+05	1.04E+06
7.33E+05	6.59E+05	7.18E+05	8.05E+05	6.44E+05	7.35E+05	7.52E+05	6.92E+05	6.69E+05
8.29E+05	8.01E+05	9.04E+05	1.06E+06	8.40E+05	8.47E+05	8.06E+05	8.78E+05	8.69E+05
8.99E+05	8.54E+05	8.60E+05	9.16E+05	9.00E+05	8.57E+05	9.42E+05	9.29E+05	8.47E+05
1.03E+06	1.03E+06	1.12E+06	1.04E+06	8.66E+05	8.71E+05	8.39E+05	8.81E+05	7.98E+05
7.58E+05	8.69E+05	6.97E+05	7.31E+05	8.19E+05	1.00E+06	8.09E+05	9.39E+05	8.29E+05
8.02E+05	7.53E+05	7.02E+05	6.44E+05	7.85E+05	8.25E+05	9.45E+05	8.31E+05	7.63E+05
7.79E+05	7.69E+05	7.73E+05	8.35E+05	8.13E+05	7.55E+05	7.35E+05	8.00E+05	7.33E+05
9.14E+05	9.78E+05	9.71E+05	1.09E+06	9.81E+05	1.01E+06	9.33E+05	8.67E+05	1.07E+06
9.81E+05	8.62E+05	1.20E+05	9.61E+05	1.16E+06	9.13E+05	1.05E+06	9.41E+05	1.19E+06
6.54E+05	7.18E+05	6.99E+05	7.62E+05	6.65E+05	8.11E+05	7.16E+05	7.55E+05	7.39E+05
8.73E+05	7.11E+05	7.51E+05	7.58E+05	7.78E+05	9.71E+05	8.71E+05	1.02E+05	7.87E+05
8.67E+05	8.75E+05	8.97E+05	8.82E+05	8.41E+05	9.01E+05	7.47E+05	7.57E+05	7.45E+05

【0345】 體內研究（劑量3）。此研究評估 $\epsilon$ -CO CAR T細胞與 $\zeta$ 1xx CAR T細胞之抗腫瘤功效及PK。與治療開始時之初始值相比，各種時間點之體重變化總結於表67中。在以下組中隨時間而增加腫瘤負荷：在4e4及2e5劑量下之媒劑、NTD、 $\epsilon$ -CO、及 $\zeta$ 1xx，引起平均體重減輕及/或不良臨床徵象，之後自研究中移除所有動物。相比之下，來自 $\epsilon$ -CO及 $\zeta$ 1xx之所有小鼠在1e6劑量下由於腫瘤負荷之顯著控制而在研究期間維持一致體重。

【0346】 各實驗組之BLI總結於表68中。媒劑與NTD組顯示無腫瘤控制，且由於高腫瘤負荷而在第26天被安樂死。在4e4劑量組中， $\epsilon$ -CO組的5隻小鼠中有1至2隻小鼠及 $\zeta$ 1xx組的5隻小鼠中有3隻小鼠顯示無腫瘤控制，且由於高腫瘤負荷而被安樂死。在2e5之劑量下，僅 $\zeta$ 1xx組的5隻小鼠中有2隻小鼠顯示無腫瘤控制。相比之下，在2e5之劑量下的 $\epsilon$ -CO小鼠皆控制了腫瘤，直至第57天此劑量之終點，除了第7組中的1隻小鼠在第26天被發現死亡。所有高劑量構築體，在1e6下之 $\epsilon$ -CO及 $\zeta$ 1xx，維持腫瘤控制直至第57天，之後各組用Nalm6 MHC I/II DKO腫瘤植入再攻擊。直至研究終止之第105天，所有經再攻擊之組，在1e6下之 $\epsilon$ -CO及 $\zeta$ 1xx同樣維持完全腫瘤清除。

表67

腫瘤接種後天數	G1.媒劑					G2.NTD					G3.ε-CO (1e6)					G4.ε-CO (2e5)				
	5	3.7	5.8	1	8.2	0.5	0.4	1.2	0.5	5.3	4.7	-4.7	-1.6	-2.5	0.4	-2	4.8	-1.2	-1.3	-0.9
7	4.6	0.5	2	7.7	-0.5	0	6.1	-3.2	6.2	6.5	-3	-2	-0.8	2	-1.2	7	-0.4	0.4	0.4	3.4
11	4.1	0.5	-0.5	6.8	0.5	3.1	5.3	-4.6	7.2	5.6	-3	-0.4	0.4	0.4	1.2	8.1	-2.4	0.4	0.4	3.8
15	3.7	-1.4	0	7.2	0	-0.9	3.2	-5.9	7.7	3.4	-4.3	-1.6	-0.4	0	-1.2	8.6	-2	1.3	1.3	6.4
19	8.3	0.5	-0.5	7.7	1.9	0	5.7	2.3	7.2	0.4	-2.6	1.2	4.7	0	-1.6	8.1	1.2	-0.4	2.6	2.1
22	5.5	-2.4	0.5	6.3	0.5	-2.2	2.4	0.5	4.8	-0.9	-1.7	2	5.9	0.4	-0.4	8.6	0	0	4.8	2.1
26	-7.8	-13.5	-7.4	1.4	-3.8	-10.3	-2.8	-7.8	-1.9	-11.2	-0.4	3.6	6.4	-0.4	-1.6	12.4	0.4	2.2	9.3	7.7
29											2.1	11.3	8.9	0.4	2.8	15.1	-0.4	4	7	7.2
33											6.8	15.4	14.4	2.8	5.7	17.7	2.9	11	8.4	9.8
36											8.5	13.8	13.6	7.2	6.1	28	6.9	11	11	13.6
43											7.3	10.1	13.6	5.6	4.9	29.6	2.4	7	9.3	3.8
47											3	11.7	16.5	9.6	7.7	26.9	2.9	1.8	4.4	6.4
50											3.8	9.3	15.3	12.8	4.5	25.8	2.4	4.4	4.4	6.4
54											11.5	15	22.9	20.4	8.1	28	7.8	10.6	9.7	10.2
57											8.1	14.2	20.3	22.8	8.5	32.3	10.6	7.5	11.5	11.9
67											9	17.4	19.1	14.8	3.3					
81											5.6	22.7	14.4	16	6.5					
84											9.4	11.3	17.8	21.6	10.6					

88											14.5	19	13.6	18.8	14.2						
95											6.4	16.2	12.7	20.4	5.7						
99											7.7	13	11	24.4	4.9						
104											11.1	25.5	20.8	25.6	9.3						

表67 (續1)

G5.ε-CO (4e4)					G6.ε CO (Δ181-185) (1e6)					G7.εCO (Δ 181-185) (2e5)					G8.εCO (Δ 181-185) (4e4)				
2.7	0.4	-0.5	-1.6	0	-2.5	-1.2	0.8	0.5	0.4	-3.3	0.5	4.6	0.5	5.7	-2.5	-1.3	-0.4	-2.2	-1.9
2.3	0.4	-1.4	0	1.2	-3	-2.8	1.2	1.4	-3.1	-4.1	0	5.1	-1.9	4.7	-3	-0.4	0.4	-2.7	-1
2.7	0.8	-0.5	0.8	2.4	5.5	-3.2	5.1	1.8	-3.1	-10.3	-1.1	3.2	-2.4	2.1	-6.4	-1.3	1.1	-2.7	2.4
0.5	-2.1	-0.5	1.6	0	4.7	-2.4	2.7	3.6	-2	-9.5	0	3.7	0	4.2	-9.7	-3.1	-7.2	-4.4	1.4
1.8	4.6	0	2	-1.2	4.7	-4	3.5	5	1.6	-7	5.8	1.9	1.9	4.7	-5.9	2.2	2.6	4	5.3
3.2	7.1	1.9	4.4	0	5.5	-3.6	2.7	6.3	2	-6.2	6.3	1.9	3.3	5.7	-5.5	1.3	1.5	4.9	5.7
6.4	6.7	3.3	2	0	8.5	0.8	7.8	7.2	5.9	-0.4	8.4	11.1		10.9	-1.7	5.3	2.6	4.4	9.1
12.8	0.4	6.2	-0.8	3.6	8.5	0.8	8.2	8.1	4.7	2.9	9.5	5.6		9.9	1.7	6.2	4.5	6.7	11.5
20.1	-7.9	10.4	-4.4	8	12.3	5.2	7.8	7.7	4.7	0	11.1	6.5		13.5	6.8	10.1	9.4	4.9	4.3
14.6	-24.3	12.3	-23.7	14	20.3	8.4	14.4	12.6	7.8	6.6		22.1	9.7	20.3	9.7	17.6	8.3	14.2	-6.7
18.3		11.8		8.4	9.7	10.8	17.1	15.8	9.4	-1.2		22.1	7.9	21.9	5.5	18.9	9.4	4.4	-24.4
15.5		19		10.8	9.7	2.4	12.8	10.4	3.5	3.3		24.7	10.2	26.6	4.2	14.1	6.8	8.4	
11		16.6		11.2	10.6	5.6	15.6	13.1	3.5	2.9		22.1	10.2	30.7	5.9	14.1	3.8	11.6	
13.2		16.6		9.6	20.3	6	25.7	17.1	7.5	-0.8		22.6	14.4	29.2	6.4	24.7	-6.4	18.7	

21		19.9		13.6	18.2	8	24.1	19.4	11.4	3.7		25.3	15.7	37.5	8.9	19.4	8.3	14.2	
					12.3	5.6	30.7	23	11.4										
					14.4	10.4	23.3	17.1	7.5										
					15.7	12.4	26.1	21.2	6.7										
					24.2	15.3	25.3	27	12.9										
					15.3	9.2	24.5	19.4	9										
					14	7.6	27.2	19.4	12.5										
					20.3	16.5	24.1	14.4	12.9										

表67 (續2)

G9.ε CO (R183K) (1e6)					G10.ε CO (R183K) (2e5)					G11.ε CO (R183K) (4e4)					G12.ζ1xx (1e6)				
-1.8	-0.9	2.7	-0.5	-0.4	-0.9	7.6	0	-1	1.2	-3.3	-1	0.9	2.1	0	0	1.4	0.9	1	-0.5
-7.1	-0.5	3.6	-0.5	0.4	0.9	7.2	1.8	1	0	-4.1	-1.6	0.4	2.6	1	1.4	1.9	0.9	0.5	-1.4
-5.4	-1.9	3.6	-1	-1.7	-0.4	0.4	-0.4	2.9	4.3	-2.1	4.1	3.5	3.4	1	1.9	1.4	4.8	0.5	3.3
-5.4	2.3	3.2	1	-0.9	0.4	1.3	0	4.4	5.5	-2.9	5.2	4.4	3.8	4.2	2.8	1.9	3.9	3.1	4.7
-8.9	2.3	0	-0.5	-0.4	-0.9	4.5	3.6	2.9	4.9	-1.2	4.1	1.3	2.6	5.7	4.2	1.4	4.4	6.2	1.9
-7.6	3.7	1.4	1	1.3	-1.3	4.9	2.2	4.4	6.1	-1.2	4.7	1.8	1.7	6.3	4.2	2.3	0.4	8.2	3.3
-5.4	6.5	5	9.6	5.1	1.7	1.3	9.4	9.3	8.6	2.5	6.7	4.4	4.3	9.4	4.2	3.7	4.4	9.3	8.5
-4	10.2	5.4	14.1	6.4	5.1	4.9	13.8	7.8	13.5	0.8	3.6	7.1	1.7		6.1	1.9	8.3	13.4	7.5
-1.8	16.3	9.5	22.7	14.5	8.1	9.9	17.4	10.8	13.5	-2.9	7.8	11.9	6		8.5	4.2	9.6	13.9	11.7
1.3	22.3	11.3	16.2	19.1	9.4	12.6	22.3	11.3	1.9	-25.5	19.2	11.5	13.2		13.7	15.9	17	22.7	18.3

8.9	22.3	21.6	18.7	19.1	6.4	11.2	17.4	6.4	25.2		20.7	15	8.1		17.9	20.6	17.9	16.5	21.1
11.2	14	14.9	23.7	14	10.3	12.1	20.5	7.4	28.8		23.3	11.1	9.8		20.3	15.9	18.8	14.9	23.5
-0.9	19.5	14.9	22.7	12.3	10.7	9.4	19.6	7.8	25.8		25.4	12.8	9		17.9	16.8	16.6	15.5	23
2.2	25.6	16.2	22.7	21.3	11.5	10.3	21.4	8.8	27		17.1	12.4	2.6		17	17.3	19.2	19.1	25.8
7.6	26.5	19.8	21.7	21.3	10.7	11.2	20.5	13.2	30.1		20.2	14.6	6.4		22.2	17.8	21	23.2	22.1
0.9	20.9	17.1	29.3	18.3											19.8	20.6	24.5	19.6	22.1
3.1	25.1	23	19.7	18.3											20.8	25.2	24.5	19.1	24.4
6.3	23.7	28.4	23.7	15.3											21.7	31.8	23.6	22.7	23.5
8.5	25.1	19.8	24.7	18.7											24.1	33.6	30.6	28.4	21.6
4.9	27	18	25.8	24.7											25	24.3	34.9	23.2	21.1
0.9	24.2	18.5	24.2	20.9											24.1	24.3	33.2	24.2	23
11.6	30.7	17.1	31.8	20.9											28.3	25.2	38.9	27.3	27.7

表67 (續3)

										用於腫瘤再攻擊之 G15.媒劑			
G13.ζ1xx (2e5)					G14.ζ1xx (4e4)								
-0.9	-1.6	8.4	2.4	0.5	6.1	2.4	-3.7	5.9	1.3				
-2.8	-3.6	8.9	1.9	0	6.5	3.3	-2.8	5.4	1.3				
-0.5	-3.6	8.4	5.2	3.2	7.9	1.4	-0.5	2.5	3.1				
0.9	-2.1	8.9	6.7	4.5	8.9	1.9	0.9	3	4.5				
2.3	0.5	12.3	6.7	5.9	12.6	4.7	3.7	3	4.5				

1.9	0	11.8	6.2	7.3	15	5.2	5.1	3.4	7.1				
7.9	9.3	11.3	10.5	2.7	17.3	5.7	1.9	4.4	7.1				
6.9	9.8	13.3	12.9	3.6	19.2	-3.3	-0.9	3.9	3.6				
6.9	11.4	10.3	16.2	1.8	20.6	-14.2	-19.2	10.3	3.6				
10.2	8.3	15.3	9	2.7	25.2			18.2					
4.6	-9.8	11.3	-17.1	1.8	16.8			17.2					
6.5	-25.9	9.9		6.4	19.6			16.7					
4.6		12.8		7.3	16.8			14.3					
12.5		17.2		4.5	21.5			17.2					
17.6		12.8		5	22			16.3					
										27.6	19.9	23.7	6.8
										30	24.4	28.4	8.9
										25.2	27.9	22.3	11
										10.5	10.9	11.6	-5.1

表68

腫瘤接種後天數	G1.媒劑					G2.NTD				
	5	5.06E+06	3.42E+06	3.29E+06	2.42E+06	3.84E+06	2.65E+06	1.66E+06	2.54E+06	1.95E+06
7	2.15E+07	1.82E+07	1.17E+07	1.46E+07	1.25E+07	2.31E+07	9.88E+07	1.73E+07	1.55E+07	1.40E+07
11	8.43E+08	9.38E+08	8.31E+08	8.70E+08	1.05E+09	1.10E+09	5.48E+08	8.93E+08	6.36E+08	8.21E+08
15	4.45E+09	4.93E+09	7.04E+09	8.68E+09	6.46E+09	4.01E+09	5.02E+09	6.74E+09	5.85E+09	3.96E+09
19	1.85E+10	1.96E+10	1.07E+10	1.60E+10	1.79E+10	1.36E+10	1.46E+10	1.50E+10	1.28E+10	1.53E+10
22	2.53E+10	3.08E+10	2.97E+10	3.43E+10	3.83E+10	3.11E+10	3.07E+10	3.16E+10	3.11E+10	3.72E+10
26		3.69E+10	5.30E+10	4.98E+10	4.92E+10	4.31E+10	4.71E+10	4.74E+10	3.82E+10	
29										
33										
36										
40										
43										
47										
50										
54										
57										
67										
76										

81										
84										
88										
92										
96										
99										
105										

表68 (續1)

G3.ε-CO (1e6)					G4.ε-CO (2e5)				
1.63E+06	1.79E+06	1.81E+06	1.81E+06	2.56E+06	2.67E+06	1.72E+06	2.50E+06	3.15E+06	1.94E+06
1.23E+06	1.43E+06	1.04E+06	1.21E+06	1.46E+06	6.35E+06	7.49E+06	6.52E+06	1.39E+07	5.45E+06
1.07E+06	1.81E+06	1.10E+06	1.27E+06	1.38E+06	2.87E+06	4.05E+06	5.89E+06	1.68E+07	7.22E+06
1.41E+06	1.51E+06	1.24E+06	1.33E+06	1.23E+06	1.83E+06	3.99E+06	5.97E+06	1.46E+07	4.02E+06
9.60E+05	8.80E+05	9.09E+05	1.17E+05	1.04E+06	1.02E+06	1.49E+06	1.09E+06	1.13E+06	1.07E+06
8.93E+05	9.23E+05	7.23E+05	7.74E+05	1.70E+05	9.40E+05	1.21E+06	1.09E+06	1.14E+06	1.32E+06
8.80E+05	9.37E+05	9.53E+05	9.57E+05	9.83E+05	1.25E+06	1.31E+06	8.89E+05	1.10E+06	1.18E+06
1.19E+06	1.20E+06	1.07E+06	1.40E+06	1.19E+06	1.24E+06	1.35E+06	9.17E+05	1.13E+06	1.15E+06
8.76E+05	9.83E+05	8.77E+05	8.80E+05	8.29E+05	1.28E+06	1.30E+06	1.33E+06	1.04E+06	1.33E+06
8.07E+05	8.70E+05	6.07E+05	7.18E+05	7.65E+05	1.13E+06	1.21E+06	9.41E+05	1.14E+06	1.21E+06
7.86E+05	8.55E+05	1.10E+05	8.35E+05	9.46E+05	1.17E+06	1.15E+06	1.02E+06	1.05E+06	1.24E+06

1.55E+06	1.34E+06	1.25E+06	1.45E+06	1.14E+06	1.24E+06	1.31E+06	1.09E+06	1.28E+06	1.30E+06
1.18E+06	1.42E+06	1.17E+06	1.13E+06	1.03E+06	1.11E+06	1.17E+06	1.27E+06	9.18E+05	9.65E+05
8.62E+05	1.18E+06	8.75E+05	1.10E+06	1.01E+06	1.30E+06	1.29E+06	8.71E+05	1.04E+06	8.90E+05
8.61E+05	1.02E+06	1.02E+05	9.86E+05	9.36E+05	1.22E+06	1.04E+06	8.71E+05	8.82E+05	8.27E+05
8.79E+05	9.78E+05	8.27E+05	1.16E+06	9.38E+05	1.08E+06	1.36E+06	1.02E+06	1.12E+06	1.05E+06
5.02E+05	5.27E+05	6.89E+05	5.51E+05	5.35E+05					
8.62E+05	8.14E+05	9.70E+05	8.40E+05	6.35E+05					
9.43E+05	1.24E+06	1.03E+05	9.15E+05	8.18E+05					
5.07E+05	6.80E+05	5.79E+05	5.62E+05	5.67E+05					
6.75E+05	7.56E+05	6.41E+05	7.63E+05	7.12E+05					
8.91E+05	8.19E+05	8.84E+05	8.21E+05	8.16E+05					
7.47E+05	9.10E+05	8.79E+05	8.10E+05	7.31E+05					
7.01E+05	6.47E+05	7.91E+05	6.81E+05	6.00E+05					
5.74E+05	5.92E+05	5.66E+05	6.06E+05	6.63E+05					

表68 (續2)

G5.ε-CO (4e4)					G6.εCO (Δ 181-185) (1e6)				
1.84E+06	1.50E+06	7.13E+05	1.65E+06	1.70E+06	1.96E+06	2.06E+06	2.09E+06	3.88E+06	2.23E+06
8.92E+06	7.41E+06	1.51E+07	9.48E+06	7.71E+06	1.94E+06	1.36E+06	1.73E+06	1.96E+06	2.10E+06
8.68E+07	7.78E+07	2.46E+08	1.31E+08	6.56E+07	1.16E+06	1.13E+06	1.37E+06	1.46E+06	1.15E+06
5.40E+08	8.16E+08	7.58E+08	8.96E+08	2.38E+08	1.47E+06	1.46E+06	1.38E+06	1.57E+06	1.44E+06

3.23E+07	2.74E+09	3.70E+08	1.00E+09	1.50E+09	9.24E+05	1.08E+06	1.01E+06	9.73E+05	1.44E+05
2.41E+08	3.50E+09	5.98E+07	4.53E+09	5.50E+07	1.06E+06	1.13E+06	1.04E+06	1.05E+06	1.04E+06
1.10E+08	9.13E+09	1.94E+08	1.13E+10	1.28E+08	1.04E+06	1.05E+06	1.03E+06	1.19E+06	1.05E+06
1.61E+08	1.39E+10	3.12E+08	1.55E+10	3.02E+08	1.06E+06	1.10E+06	1.09E+06	1.05E+06	8.45E+05
5.95E+08	3.80E+10	1.09E+09	5.72E+10	9.93E+08	1.01E+06	9.77E+05	8.65E+05	9.75E+06	1.37E+06
1.26E+09	9.87E+10	2.90E+09	7.34E+10	2.12E+09	1.03E+06	9.62E+05	1.21E+06	1.03E+06	1.47E+06
1.14E+06		9.54E+05		1.15E+06	1.43E+06	1.06E+06	9.10E+05	1.06E+06	1.24E+06
1.27E+06		1.11E+06		1.21E+06	9.30E+05	1.17E+06	1.29E+06	9.96E+05	1.07E+06
1.18E+06		9.67E+05		9.68E+06	9.68E+05	9.41E+05	8.96E+05	9.98E+05	9.07E+05
1.01E+06		8.99E+05		1.24E+06	9.40E+05	9.64E+05	1.03E+06	1.10E+06	1.07E+06
9.60E+05		9.51E+05		8.81E+05	9.62E+05	9.29E+05	9.39E+05	9.78E+05	1.07E+06
9.48E+05		9.43E+05		1.22E+06	1.01E+06	9.75E+06	1.06E+06	1.11E+06	8.54E+05
					5.58E+05	5.41E+05	5.48E+05	7.06E+05	6.81E+05
					8.97E+05	1.02E+06	1.05E+06	1.02E+06	1.10E+06
					7.28E+05	8.35E+05	7.25E+05	8.55E+05	7.02E+05
					8.56E+05	9.60E+05	8.88E+05	9.88E+05	7.85E+05
					7.90E+05	7.94E+05	7.37E+05	1.02E+06	8.50E+05
					1.01E+06	9.93E+05	8.36E+05	1.09E+06	1.02E+06
					9.18E+05	9.64E+05	8.16E+05	8.42E+05	7.88E+05
					9.58E+05	1.13E+06	1.01E+06	1.20E+06	1.05E+06
					1.08E+06	1.10E+06	9.71E+05	1.12E+06	9.68E+06

表68 (續3)

G7.εCO (Δ 181-185) (2e5)					G8.εCO (Δ 181-185) (4e4)				
2.49E+06	3.89E+06	3.21E+06	2.92E+06	3.97E+06	2.43E+06	2.14E+06	2.31E+06	1.92E+06	2.28E+06
8.41E+06	1.57E+07	1.27E+07	1.16E+07	1.45E+07	1.48E+07	2.05E+07	1.52E+07	1.51E+07	1.64E+07
4.44E+06	3.81E+06	3.25E+06	3.90E+06	8.11E+06	3.48E+08	1.35E+08	1.26E+08	1.93E+08	9.64E+07
5.34E+06	5.24E+06	6.20E+06	6.32E+06	9.64E+06	8.50E+08	5.15E+08	3.35E+08	4.61E+08	2.90E+08
1.10E+06	1.09E+06	9.63E+06	1.29E+06	8.28E+05	2.54E+09	1.44E+09	1.29E+09	3.39E+09	1.28E+09
1.09E+06	1.19E+06	1.20E+06	1.29E+06	1.29E+06	2.19E+09	1.16E+09	3.40E+08	1.50E+09	2.48E+09
1.01E+06		9.24E+05	1.06E+06	1.09E+06	3.92E+07	4.38E+09	4.82E+07	7.16E+08	1.94E+07
8.91E+05		1.10E+06	1.05E+06	9.98E+05		5.07E+07	1.35E+07	1.23E+08	1.37E+10
1.04E+06		9.58E+05	1.10E+06	1.07E+06	2.13E+07	4.72E+07	2.24E+07	4.20E+08	3.45E+10
9.27E+05		9.50E+05	1.06E+06	8.82E+05	1.59E+05	3.01E+07	2.30E+07	3.93E+08	3.10E+10
8.92E+05		8.15E+05	1.07E+06	9.90E+05	1.87E+07	1.51E+07	2.29E+07	2.77E+08	3.44E+10
1.17E+06		1.15E+06	1.19E+06	1.10E+06	4.36E+07	2.92E+07	3.73E+07	5.04E+08	7.55E+10
8.59E+05		8.56E+05	9.95E+05	9.73E+05	9.75E+05	2.83E+06	1.06E+06	9.37E+05	
8.59E+05		8.56E+05	9.95E+05	9.73E+05	9.79E+05	1.56E+06	9.66E+05	9.22E+05	
1.06E+06		1.09E+06	1.02E+06	1.12E+06	1.15E+06	4.66E+06	9.79E+05	1.09E+06	
9.24E+06		9.54E+05	9.85E+05	1.08E+06	1.01E+06	1.27E+07	1.29E+06	9.40E+05	


表68 (續4)

G9.ε CO (R183K) (1e6)					G10.ε CO (R183K) (2e5)				
3.05E+06	4.45E+06	2.32E+06	2.89E+06	3.33E+06	2.11E+06	2.23E+06	2.96E+06	2.84E+06	3.50E+06
1.73E+06	2.00E+06	2.09E+06	1.11E+06	1.80E+06	1.00E+07	1.59E+07	1.70E+07	1.55E+07	1.91E+07
1.13E+06	1.44E+06	1.02E+06	1.44E+06	1.18E+06	2.92E+06	7.70E+06	1.35E+07	9.31E+06	1.28E+07
1.48E+06	1.28E+06	1.18E+06	1.45E+06	1.61E+06	2.70E+06	9.03E+06	2.23E+07	1.80E+07	2.60E+07
1.25E+06	1.21E+06	9.96E+05	9.49E+05	1.20E+06	1.11E+06	1.56E+06	3.26E+07	3.51E+06	2.15E+06
1.13E+06	1.14E+06	1.00E+06	1.09E+06	1.05E+06	9.22E+05	1.02E+06	2.52E+06	1.04E+06	1.11E+06
1.11E+06	1.05E+06	1.03E+06	9.12E+05	1.05E+06	9.09E+05	1.10E+06	1.18E+06	1.04E+06	1.03E+06
1.08E+06	9.12E+05	9.06E+05	9.64E+05	9.38E+05	1.18E+06	1.15E+06	1.01E+06	1.04E+06	1.12E+06
1.31E+06	1.36E+06	1.12E+06	1.15E+06	1.40E+06	1.21E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.28E+06	1.11E+06
1.27E+06	1.10E+06	1.05E+06	1.11E+06	1.09E+06	7.80E+05	1.05E+06	1.15E+06	9.95E+05	1.27E+06
6.04E+06	5.69E+05	6.25E+05	6.51E+05	6.21E+05	7.45E+05	6.58E+05	6.15E+05	7.80E+05	8.52E+05

1.04E+06	1.06E+06	1.02E+06	1.20E+06	1.29E+06	1.20E+06	1.31E+06	1.11E+06	1.00E+06	9.90E+06
1.08E+06	1.06E+06	1.08E+06	1.12E+06	9.11E+05	1.02E+06	1.26E+06	9.20E+05	1.03E+06	1.07E+06
1.00E+06	9.91E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.04E+06	9.10E+05	1.11E+06	8.31E+05	1.11E+06	1.02E+06
8.98E+05	1.12E+06	1.10E+06	1.15E+06	1.04E+06	9.41E+05	1.07E+06	7.66E+05	9.14E+05	8.88E+05
1.03E+06	1.01E+06	1.27E+06	9.90E+05	1.05E+06	1.10E+06	1.33E+06	9.35E+05	1.16E+06	1.02E+06
4.98E+05	4.73E+05	4.89E+05	4.73E+05	5.26E+05					
8.61E+05	1.24E+06	7.65E+05	9.46E+05	1.04E+06					
8.54E+05	1.11E+06	9.42E+05	7.41E+05	1.03E+06					
1.10E+06	9.41E+05	8.73E+05	9.10E+05	9.83E+05					
8.32E+05	6.89E+05	8.78E+05	8.62E+05	8.13E+05					
9.05E+05	1.10E+06	6.72E+05	1.05E+06	9.59E+05					
6.20E+05	8.26E+05	5.50E+05	8.37E+05	1.06E+06					
1.15E+06	7.29E+05	8.90E+05	1.02E+06	9.10E+05					
9.11E+05	7.75E+05	9.10E+05	9.21E+05	9.06E+05					

表68 (續5)

G11.ε CO (R183K) (4e4)					G12.ζ1xx (1e6)				
3.42E+06	3.48E+06	2.87E+06	2.64E+06	4.54E+06	4.92E+06	5.44E+06	2.29E+06	5.23E+06	5.31E+06
3.15E+07	3.23E+07	2.39E+07	2.99E+07	5.13E+07	2.86E+06	3.50E+06	2.35E+06	2.97E+06	3.80E+06
2.90E+08	2.77E+08	3.31E+08	3.05E+08	6.05E+08	1.23E+06	1.30E+06	1.54E+06	1.21E+06	1.35E+06
9.78E+08	1.09E+09	1.03E+09	9.80E+08	1.93E+09	1.32E+06	1.39E+06	1.23E+06	1.32E+06	1.10E+06

6.40E+09	6.18E+09	7.47E+09	6.27E+09	8.15E+09	1.61E+06	1.26E+06	1.19E+06	1.34E+06	8.34E+06
6.53E+09	3.96E+09	3.49E+09	2.12E+09	1.16E+10	1.01E+06	8.33E+05	8.40E+05	9.04E+05	3.67E+06
1.72E+10	4.60E+08	1.73E+08	2.71E+08	2.61E+10	1.13E+06	1.10E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.09E+06
2.34E+10	2.09E+08	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05
5.72E+10	8.33E+08	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06
	9.93E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05
	3.09E+07	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05
	2.83E+07	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05
	2.35E+07	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06
	4.55E+07	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06
	9.92E+07	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05
	1.13E+07	1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06
					6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05
					1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05
					1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05
					7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05
					8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05
					1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05
					1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06
					9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05
					8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05

表68 (續6)

G13.ζ1xx (2e5)					G14.ζ1xx (4e4)					G15.用於腫瘤再攻擊之媒劑			
5.16E+06	4.12E+06	4.29E+06	3.82E+06	6.70E+06	3.50E+06	4.83E+06	7.91E+06	3.89E+06	5.66E+06				
7.07E+07	3.38E+07	2.49E+07	3.05E+07	4.36E+07	2.70E+07	2.62E+07	4.92E+07	3.02E+07	2.56E+07				
5.18E+07	1.02E+07	1.67E+07	1.31E+07	1.61E+07	2.69E+08	2.95E+08	7.03E+08	2.66E+08	4.95E+08				
3.43E+07	1.07E+07	2.41E+07	1.19E+07	1.64E+07	1.12E+09	6.51E+08	2.09E+09	5.76E+08	1.32E+09				
1.47E+08	5.87E+07	7.69E+07	3.99E+07	2.47E+07	1.18E+09	1.46E+09	4.70E+09	1.37E+09	3.08E+09				
3.12E+08	1.65E+08	2.87E+08	7.41E+07	2.73E+07	8.22E+08	2.93E+09	7.11E+09	3.40E+08	2.94E+09				
2.27E+09	1.65E+09	1.41E+09	5.62E+08	1.85E+07	1.70E+09	8.90E+09	1.37E+10	2.14E+08	6.80E+09				
1.01E+08	4.24E+09	8.58E+09	2.81E+09	9.40E+09	2.32E+09	2.32E+10	2.03E+10	4.45E+08	1.19E+10				
1.62E+10	9.97E+09	2.14E+10	8.42E+09	3.01E+08	2.09E+09	2.01E+10	3.62E+10	1.49E+09	4.40E+10				
1.08E+09	3.22E+10	7.31E+08	2.47E+10	7.26E+08	9.23E+06			1.31E+08					
4.69E+08	3.13E+10	9.25E+08	4.70E+10	1.13E+09	3.05E+06			4.50E+07					
1.47E+09	7.26E+10	1.98E+09	4.87E+10	1.40E+09	1.66E+06			2.59E+07					
1.03E+09	6.28E+10	1.20E+09		5.39E+07	6.69E+05			3.41E+06					
3.12E+06		3.79E+06		3.22E+06	1.08E+06			3.66E+06					
5.93E+06		1.32E+07		1.77E+08	1.09E+06			4.72E+06					
5.86E+06		3.73E+07		9.73E+08	1.04E+06			8.88E+06					

										1.21E+06	1.22E+06	1.15E+06	1.24E+06
										1.69E+06	2.21E+06	1.74E+06	1.92E+06
										6.91E+07	1.23E+08	4.24E+07	8.53E+07
										3.01E+09	3.20E+09	2.37E+09	2.22E+09
										4.81E+09	5.50E+09	4.69E+09	4.94E+09

【0347】 離體ddPCR分析。為了評估體內CAR T細胞擴增及持久性，經由ddPCR針對每 $\mu\text{g}$ 之基因體DNA (gDNA)之CAR複本分析周邊血液（表69）。在小鼠之周邊血液中偵測到 $\zeta 1 \times \times$  CAR T細胞，但相較於 $\epsilon$ -CO擴增有限。所有 $\epsilon$ -CO組同樣證實了小鼠之周邊血液中之穩健CAR T細胞擴增及持久性，尤其是在 $2e5$ 及 $4e4$ 治療組中。

表69

腫瘤接種後 天數	G1.媒劑					G2.NTD					G3.ε-CO (1e6)					G4.ε-CO (2e5)				
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	329.67	242.62	743.49	581.48	465.02	73	36.41	184.25	84.31
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2148.61	736.43	3049.64	1111.11	733.62	101.67	297.34	97.52	48.29	192.99
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6139.29	6331.33	4301.27	7192.81	3089.58	9365.08	3182.9	12211.67	3785.66	5860.66
28											2579.25	1767.5	1622.14	1958.58	837.7	16474.46	4720.97	7252.28	3340.53	3412.55
35												5008.08	3562.14	3990.33	2107.82	1700.77	10178.57	3930.85	11362.67	11500.95
42											2457.83	2160.15	1234.44	2256.06	1431.61	22877.85	8703.7	2144.69	6166.19	12860.52

表69 (續1)

G5.ε-CO (4e4)					G6.εCO (Δ 181-185) (1e6)					G7.εCO (Δ 181-185) (2e5)				
34.06	13.7	20.8	35.75	16.99	300.66	795.45	479.78	278.88	327.87	81.7	61.68	40.99	83.75	78.13
505.72	57.64	122.35	45.18	97.15	472.97	394.62	981.82	234	176.42	30.67	71.17	14.81	35.63	61.19
401.29	61.76	454.55	88.24	340.78	5370.22	2657.34	5684.36	2874.16	3215.74	5654.45	1536.44	10466.96	3611.35	3330.63
1103.8	339.09	4287.62	615.31	5737.18	1300.37	1804.74	2051.76	1742.52	1395.66	1362.23	12794.9	14279.97	0	5024.33
15541.85	1938.11	9038.63	2081.73	17734.86	557.62	1428.73	2884.78	2976.3	357.14	537.58	0	14614.3	7491.18	0
3477.81	0	6799.7	0	19946.81	1460.99	150.79	1142.48	1096.24	692.52	606.52	0	3477.12	8501.2	2880.75

表69 (續2)

G8.εCO (Δ 181-185) (4e4)					G9.ε CO (R183K) (1e6)				
1.8	1.43	4.66	1.81	0	261.81	643.01	591.49	409.32	345.47
285.04	424.96	224.09	73.42	43.52	733.27	702.27		0	473.8
1092.8	823.42	728.76	1044.1	236.58	2493.42	2069.89	2244.9	3132.53	1287.73
1746.31	3692.52	197.69	1671.36	1826.92	833.9	1157.63	1465.59	1106.35	1096.41
2623.38	1837.27	1676.07	822.7	957.03	1216.49	1942.43	1989.27	1128.3	6210.77
3398.13	3627.85	1900.65	1966.69	1043.93	3768.39	0	3502	874.7	735.53

表69 (續3)

G10.ε CO (R183K) (2e5)					G11.ε CO (R183K) (4e4)				
120.9	113.74	0	97.33	226.69	16.82	40.63	29.49	16.87	13.21
116.14	234.99	131.04	65.94	86.73	37.59	70.92	84.37	29.98	95.92
8213.58	3532.34	992.7	1203.93	2547.33	171.06	298.3	102.12	173.89	31.45
2378.69	4095.74	1510.42	1446.77	8071.43	732.54	2266.24	1123.09	1055.16	1785.71
5681.21	9858.1	2149.95	8534.67	7705.19	3992.95	400	1279.83	272.02	2291.99
7585.11	5750.69	1527.86	4683.12	5032.8		171.37	1902.79	90.23	

表69 (續4)

G12.ζ1xx (1e6)					G13.ζ1xx (2e5)					G14.ζ1xx (4e4)				
301.58	408.23	381.72	320.2	284.05	36.21	52.69	76.22	16.01	47.26	0	49.88	16	26.9	19.43
151.4	0	13.16	0	62.12	259.29	63.42	237.09	117.32	94.25	43.52	77.51	31.6	46.95	623.7
142.76	190.48	148.15	250.63	173.51	0	37.02	27.88	0	46	88.63	109.17		106.8	21.71
401.22	270.58	205.25	339.9	794.61	155.47	40.5	9.17	16.06	54.42	25.92	911.16	410.13	92.23	
446.99	513.91		2386.39	296.57	120.03	316.07	242.94	370.37	0	1041.12	0	0	380.23	
565.37	82.15	267.98	407.24	781.41	296.97	817.83	129.31	381.25	185.05	58.19	0	0	502.16	

【0348】 通常而言，在以下申請專利範圍中，所使用之用語不應被解讀為將申請專利範圍限制為本說明書及申請專利範圍中所揭示之具體實施例，但應被解讀為包括所有可能實施例連同此類申請專利範圍享有的等效物之完整範疇。因此，申請專利範圍不受本揭露限制。

【符號說明】 無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="C269194SEQA.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2024-10-21">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText></ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-10-18</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>K-1133-TW-NP_SL</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/256, 956</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2021-10-18</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">美商凱特製藥公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>KITE PHARMA, INC.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="en">SIGNALING DOMAINS FOR CHIMERIC ANTIGEN
RECEPTORS</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="zh">用於嵌合抗原受體之信號傳導域</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>95</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSA
LKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 2" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q2">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GVSLPDYG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q3">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DYGVS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GVSLPDY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 5" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id=" q5" >
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>IWGSETT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```



```

    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>WGSET</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>AKHYYYGGSYAMDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>

```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q9">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HYYYGGSYAMDY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HYYYGGSYAMDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q11">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
    SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q12">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RASQDISKYLN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q13">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RASQDISKYLN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q14">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RASQDISKYLN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q15">
```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HTSRLHS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q16">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HTSRLHS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q17">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HTSRLHS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q18">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQGNTLPYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q19">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QQGNTLPYT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q20">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQGNTLPYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>245</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..245</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q21">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNKSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAK
HYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 22" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q22">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 23" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q23">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKDSGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTTNYAQ
QFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAVAADWLDPWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q24">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGTFSSYA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 25" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q25">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SYAIS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 26" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>

```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q26">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGTFSSY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q27">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>IPIFGTT</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q28">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GIPIFGTTNYAQQFQG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>4</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..4</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q29">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PIFG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q30">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>AREAVAADWLDP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q31">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>EAVAADWLDP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="32">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q32">
```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AVAADWLD</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 33" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q33">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
    FSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYGSRRFTFGPGTKVDIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 34" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>

```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q34">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVSSSY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q35">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RASQSVSSSYLA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 36" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q36">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SQSVSSSY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 37" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>

```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 38" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q37">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GASSRAT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 39" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 40" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q38">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQYGSSRFT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q39">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQYGSSRFT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 42" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q40">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YGSSRF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 43" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>245</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..245</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q41">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSRFTFGPGTKVDIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGS
SVKVSCKDSSGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQFQGRVITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC
AREAVAADWLDPWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q42">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MALPVTALLLPLALLLHAARP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 45" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 46" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q43">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GGGSGGGS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 47" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>39</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..39</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>IEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLPGPSKP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 48" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>30</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..30</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q45">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="49">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>55</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..55</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q46">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="50">

```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q47">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="51">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q48">
```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="52">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>55</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..55</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q49">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGLNQRRRI</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="53">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>165</INSDSeq_length>

```

```

<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..165</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q50">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aagaaccggaaggccaaggccaagcctgtgacaagaggtgctggtgctggcggcagacagag
aggccagaacaagaagacctcctcctgtgcctaatacctgactacgagcccatccggaagggccagagagatctgtaca
gcgccctgaaccagcggcgatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="54">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>165</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..165</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q51">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aagaaccgcaaagcaaaggcaaaacccgtcacacgaggagcggggcgcagggggacgacaacg
cggtcagaataaggaacgcccgcctccagtaccaaattccagattatgaaccaattcgggaagggacaacgcgatctctact
ccggtctcaatcagaggcgaatt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="55">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>45</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q52">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK</INSDSeq_sequenc
e>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="56">

```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>135</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..135</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q53">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ggacacgaaacaggcagactttctggcgccgctgatacacaggccctgctgagaaacgacca
  ggtgtaccagcctctgagagacagagatgacgcccagtactctcacctcggcggcaattgggccagaaacaag</INSDS
  eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="57">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>45</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q54">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GQDGVQRSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="58">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>135</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..135</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q55">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ggacaggatggcgtcagacagagcagagccagcgacaagcaaaccctgctgcctaacgacca
    gctgtaccagcctctgaaggacagagaggacgaccagtacagccatctgcagggcaaccagctgcggagaaac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>

```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 59" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>52</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..52</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q56">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>YFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK</INSDSeq_
sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 60" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>156</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..156</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q57">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tacttcctgggcagactggtgcctagaggaagaggagctgctgaggctgctaccagaaagca
gagaatcaccgagaccgagagcccttaccaggagctgcagggacagagaagcgcgctgtacagcgacctgaacaccaga
gacctactacaag</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="61">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>41</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..41</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q58">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>

```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 62" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>401</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..401</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q59">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
    SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
    LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIIYYCAK
    HYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAALDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVWLVVGGVLACYSLLVTVAFII
    FWVRSKRSRLHSDYMMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDY
    EPIRKGQRDLYSGLNQRRRI</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 63" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1203</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>1..1203</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q60">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gatatacagatgacccaaacgacgtctagcctcagtgcgctcactcggggatcgggtgacaat
tagctgcagggttagccaggatatttcaaaatatcttaactgggtatcaacaaaagccagatggaaccgtaaaactgctca
tataccacaccagtcgcctgcattcaggggttccgagccgcttttctgggagcggtagcgggaactgattatagcttgaca
ataagcaacctcgagcaggaagacattgcgacgtacttctgtcagcaagggaaacacgctgccgtataccttcggtggcgg
cactaaactggaaatcacgggatctacgtctggatccggaaaacctggatctggtgaaggatccactaaaggcgaagtca
agttgcaagagtctggacctggtctcgtggcacccttcacagtcactctccgcttacctgtaccgtatctggagtttcaactt
cccgactatggcgtgtcatggatagcccaaccaccgcaaaaaggcttgaatggctgggcgttatctggggatccgaaac
cacatacactctgcgctcaagtcacggctgactattataaaggacaattcaaagagccaagtgttccctgaaaatga
acagcctgcagactgatgacactgcaatatacttactgcgccaagcattactattacggcggatcttacgcgatggattat
tggggccagggcacctctgtaacagtcagctccgcgcccgcatggacaatgaaaaatccaatggcacaataattcatgt
aaaggcacaacacttgtgtcctagcccactcttcttggtccgctctaaaccgttttgggtgctcgttgtggttggaggcg
tcctggcttgttactctctgttggtagctgttagcctttataatattctgggttagaagcaaacgaagtaggcttttacat
tcagactatatgaacatgacaccaagacgccccggccccacaagaaaacactatcagccctatgctccgcctcgggactt
cgctgcttaccgaagcaagaaccgcaaagcaaaagcacaacccgctcacacgaggagcgggcgcagggggacgacaacgcg
gtcagaataaggaacgccccgctccagtaccaaattccagattatgaaccaattcgaagggacaacgcgatctctactcc
ggtctcaatcagaggcgaatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="64">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1203</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1203</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q61">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacatccaaatgacccaaaccacctcctccctgagcgcctcccttggagaccgagttaccat
ctcctgccgagcttctcaagacatctccaagtacttgaattggtatcaacaaaagcccgcaggaaccgtgaagctgctga
tctaccacacatcccggctgcactctggcgttccctcaagattctccggctcttgaagcgggaaccgactactccctgacc
atctccaacctggagcaagaggacatcgctaccttctgccaacaaggcaacaccctgccttacaccttcggaggagg
aaccaagctggagatcaccggaagcacaagcggatctggcaagcctggaagcggagagggaagcaccaagggagaggtga
agctgcaagagagcggacctggattggtggccccctcacaatccctgagcgttacatgcactgtgagcggcgtgtccctt
cctgactacggcgttctctggatccgccaacctccaagaaagggactggagtggtgggagtgatctggggaagcagac
cacctactacaactccgccctgaagagccgactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtgttccctgaagatga
actctctcaaaccgacgacaccgctatctactactgcgctaagcactactactacggaggaagctacgctatggactac
tggggacaaggcacctctgtgaccgtctctctgcccgcgctctggacaacgagaagagcaacggaaccatcatccacgt
gaaggaaagcacctgtgccccctctctctgttccctggaccctccaagccttctgggtgctcgtggtggtgggaggag
tgctggcttgctactccctgcttgtgaccgtggctttcatcatcttctgggttagaagcaagagaagcagactgctgcac
agcactacatgaacatgacccttagaaggcccgaccaccagaaagcactaccagccttacgctcctcctagagactt
cgctgcttacagaagcaagaaccggaaggccaaggccaagcctgtgacaagaggtgctggtgctggcggcagacagagag
gccagaacaagaagacctcctcctgtgcctaatcctgactacgagcccatccggaagggccagagagatctgtacagc
ggcctgaaccagcggcgatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="65">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>391</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..391</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q62">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAK
HYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAALDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVWVVGVLACYSLLVTVAFI I
FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSH
LGGNWARNK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="66">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1173</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1173</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q63">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacatccaaatgacccaaaccacctcctccctgagcgcctcccttggagaccgagttaccat
ctctgcccagcttctcaagacatctccaagtacttgaattggtatcaacaaaagcccgcggaaccgtgaagctgctga
tctaccacacatcccggctgcactctggcgttccctcaagattctccggctcttgaagcgggaaccgactactccctgacc
atctccaacctggagcaagaggacatcgctacctacttctgccaacaaggcaacaccctgccttacaccttcggaggagg
aaccaagctggagatcaccggaagcacaagcggatctggcaagcctggaagcggagaggaagcaccaagggagaggtga
agctgcaagagagcggacctggattggtggccccctcacaatccctgagcgttacatgcactgtgagcggcgtgtccctt
cctgactacggcgttctctggatccgccaacctccaagaaagggactggagtggtctgggagtgatctggggaagcgagac
cacctactacaactccgccctgaagagccgactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtgttccctgaagatga
actctctccaaaccgacgacaccgctatctactactgcgctaagcactactactacggaggaagctacgctatggactac
tggggacaaggcaccctctgtgaccgtctctctgcccgcgctctggacaacgagaagagcaacggaaccatcatccacgt
gaaggaaagcaccctgtgccccctctctctgttccctggaccctccaagccttcttggtgctcgttggtggggaggag
tgctggcttgctactccctgcttgtgaccgtggctttcatcatcttctgggttagaagcaagagaagcagactgctgcac
agcgactacatgaacatgacccttagaagggccgacctaccagaaagcactaccagccttacgctcctcctagagactt
cgctgcttacagaagcggacacgaaacaggcagacttctggcggcgtgatacacaggccctgctgagaaacgaccagg
tgtaccagcctctgagagacagagatgacgcccagctctcaccctcggcggcaattgggccagaaacaag</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>391</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..391</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDQualifier id="q64">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAK
HYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAALDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFI I
FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSH
LQGNQLRRN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="68">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1173</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1173</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q65">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gacatccaaatgacccaaaccacctcctccctgagcgcctcccttggagaccgagttaccat
ctcctgccgagcttctcaagacatctccaagtacttgaattggtatcaacaaaagccccgacggaaccgtgaagctgctga

```

```
tctaccacacatcccggctgactctggcggttccctcaagattctccggctctggaagcgggaaccgactactccctgacc
atctccaacctggagcaagaggacatcgctaccttctgccaacaaggcaacacctgccttacaccttcggaggagg
aaccaagctggagatcaccggaagcacaagcggatctggcaagcctggaagcggagaggggaagcaccaagggagaggtga
agctgcaagagagcggacctggattggtggccccctcacaatccctgagcgttacatgcaactgtgagcggcgtgtccctt
cctgactacggcgttcttgatccgccaacctccaagaaagggactggagtggctgggagtgatctggggaagcagac
cacctactacaactccgccctgaagagccgactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtgttctgaagatga
actctctccaaccgacgacaccgctatctactactgcgctaagcactactactacggaggaagctacgctatggactac
tggggacaaggcacctctgtgaccgtctcctctgccgccgctctggacaacgagaagagcaacggaaccatcatccacgt
gaagggaagcacctgtgccccctcctctgttccctggaccctccaagccttcttggtgctcgtggtggtgggaggag
tgctggcttgctactccctgcttgtgaccgtggctttcatcatcttctgggttagaagcaagagaagcagactgctgcac
agcgactacatgaacatgaccctagaaggcccgacctaccagaaagcactaccagccttacgctcctcctagagactt
cgctgcttacagaagcggacaggatggcgtcagacagagcagagccagcgacaagcaaacctgctgcctaacgaccagc
tgtaccagcctctgaaggacagagaggacgaccagtacagccatctgcagggcaaccagctgcggagaaac</INSDSeq
_sequence>
```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="69" >
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>398</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..398</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q66" >
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
</INSDFeature_qual>
```

```
</INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
```

LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMNSLQTDDTAIIYYCAK  
 HYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAALDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFI  
 FWVRSKRSLRHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGG  
 RSDVYSDLNTQRPYYK</INSDSeq\_sequence>

</INSDSeq>

</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber="70">

<INSDSeq>

<INSDSeq\_length>1194</INSDSeq\_length>

<INSDSeq\_moltype>DNA</INSDSeq\_moltype>

<INSDSeq\_division>PAT</INSDSeq\_division>

<INSDSeq\_feature-table>

<INSDFeature>

<INSDFeature\_key>source</INSDFeature\_key>

<INSDFeature\_location>1..1194</INSDFeature\_location>

<INSDFeature\_qual>

<INSDQualifier>

<INSDQualifier\_name>mol\_type</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>other DNA</INSDQualifier\_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q67">

<INSDQualifier\_name>organism</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>synthetic construct</INSDQualifier\_value>

<NonEnglishQualifier\_value>合成構築體</NonEnglishQualifier\_value>

</INSDQualifier>

</INSDFeature\_qual>

</INSDFeature>

</INSDSeq\_feature-table>

<INSDSeq\_sequence>gacatccaaatgacccaaaccacctcctccctgagcgcctcccttggagaccgagttaccat  
 ctctgcccagcttctcaagacatctccaagtacttgaattggtatcaacaaaagcccgcaggaaccgtgaagctgctga  
 tctaccacacatcccggctgcactctggcgttccctcaagattctccggctcttgaagcgggaaccgactactccctgacc  
 atctccaacctggagcaagaggacatcgctaccttctgccaacaaggcaacaccctgccttacaccttcggaggagg  
 aaccaagctggagatcaccggaagcacaagcggatctggcaagcctggaagcggagagggaagcaccaagggagaggtga  
 agctgcaagagagcggacctggattggtggccccctcaaatccctgagcgttacatgcactgtgagcggcgtgtccctt  
 cctgactacggcgttcttggatccgccaacctccaagaaaggacaggagtggctgggagtgatctggggaagcgagac  
 cacctactacaactccgccctgaagagccgactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtgttccctgaagatga  
 actctctccaaccgacgacaccgctatctactactgcgctaagcactactactacggaggaagctacgctatggactac  
 tggggacaaggcacctctgtgacctctcctctgccgccgctctggacaacgagaagagcaacggaaccatcatccacgt  
 gaaggaaagcacctgtgccccctcctctgttccctggacctccaagccttctgggtgctcgtggtggtgggaggag  
 tgctggcttgctactccctgcttgtgacctggcttccatcatctctgggttagaagcaagagaagcagactgctgcac

```
agcgactacatgaacatgaccctagaaggcccgacctaccagaaagcactaccagccttacgctcctcctagagactt
cgctgcttacagaagctacttcctgggcagactggtgcctagaggaagaggagctgctgaggctgctaccagaaagcaga
gaatcaccgagaccgagagcccttaccaggagctgcagggacagagaagcgacgtgtacagcgacctgaacaccagaga
ccttactacaag</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="71">
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>458</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..458</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q68">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
```

```
</INSDFeature_qual>
```

```
</INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAK
HYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAALDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF
FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</IN
SDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="72">
```

```
<INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>1374</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1374</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q69">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacatccaaatgacccaaaccacctcctccctgagcgcctcccttggagaccgagttaccat
ctctgccgagcttctcaagacatctccaagtacttgaattggtatcaacaaaagcccgcacggaaccgtgaagctgctga
tctaccacacatcccggctgcactctggcgttccctcaagattctccggctcttgaagcgggaaccgactactccctgacc
atctccaacctggagcaagaggacatcgctaccttcttgcacaacaggcaacaccctgccttacaccttcggaggagg
aaccaagctggagatcaccggaagcacaagcggatctggcaagcctggaagcggagagggaagcaccaagggagaggtga
agctgcaagagagcggacctggattggtggccccctcaaatccctgagcgttacatgcactgtgagcggcgtgtccctt
cctgactacggcgttcttggatccgccaacctccaagaaaggacaggagtggctgggagtgatctggggaagcgagac
cacctactacaactccgccctgaagagccgactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtgttccctgaagatga
actctctccaaaccgacgacaccgctatctactactgcgctaagcactactactacggaggaagctacgctatggactac
tggggacaaggcacctctgtgacctctcctctgccgccgctctggacaacgagaagagcaacggaaccatcatccacgt
gaaggaaagcacctgtgccccctcctctgttccctggacctccaagccttcttgggtgctcgtggtggtgggaggag
tgctggcttgctactccctgcttgaccgtggcttccatcatctcttgggttagaagcaagagaagcagactgctgcac
agcgactacatgaacatgaccttagaaggcccggacctaccagaaagcactaccagccttacgctcctcctagagactt
cgctgcttacagaagcagggtgaagtctcaagaagcgtgacgctcctgcttaccaacaaggccaaaaccaactgtaca
acgagctgaacctgggaagaagagaggaatacagcgtcctggacaagagaagaggaagagaccctgagatgggaggaaag
ccaagaagaagaacctcaagaggccctgtacaacgagctgcaaaaggacaagatggctgaggcttactccgagatcgg
aatgaaggagagagaagaagaggaaaggacacgacgactgtaccaagcctgagcaccgctaccaaggacacctacg
acgctctgcacatgcaagccctgcctccttagg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 73" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>458</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..458</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q70">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
    SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
    LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAK
    HYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAALDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFI I
    FWVRSKRSRLHSDYMMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVL D
    KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKQHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR</IN
    SDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 74" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1374</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1374</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q71">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacatccaaatgacccaaaccacctcctccctgagcgcctcccttggagaccgagttaccat
ctcctgccgagcttctcaagacatctccaagtacttgaattggtatcaacaaaagcccgcaggaaccgtgaagctgctga
tctaccacacatcccggctgcactctggcgttccctcaagattctccggctcttgaagcgggaaccgactactccctgacc
atctccaacctggagcaagaggacatcgctacctacttctgccaacaaggcaacaccctgccttacaccttcggaggagg
aaccaagctggagatcaccggaagcacaagcggatctggcaagcctggaagcggagagggaagcaccaagggagaggtga
agctgcaagagagcggacctggattggtggccccctcacaatccctgagcgttacatgcactgtgagcggcgtgtccctt
cctgactacggcgttctctggatccgccaacctccaagaaagggactggagtggtgggagtgatctggggaagcagac
cacctactacaactccgccctgaagagccgactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtgttccctgaagatga
actctctcaaaccgacgacaccgctatctactactgcgctaagcactactactacggaggaagctacgctatggactac
tggggacaaggcacctctgtgacctctctctgcccgcgctctggacaacgagaagagcaacggaaccatcatccacgt
gaaggaaagcacctgtgccccctctctctgttccctggacctccaagccttcttggtgctcgttggtggaggaggag
tgctggcttgctactccctgcttgtgacctggctttcatcatcttctgggttagaagcaagagaagcagactgctgcac
agcactacatgaacatgacccttagaaggcccgacctaccagaaagcactaccagccttacgctcctcctagagactt
cgctgcttacagaagccgggtgaagttctcaagaagcgtgacgctcctgcttaccaacaaggccaaaaccaactgtaca
acgagctgaacctgggaagaagagaggaatacgacgtcctggacaagagaagaggaagagacctgagatgggaggaaag
ccaagaagaagaacctcaagaggcctgtttaacgagctgcaaaaggacaagatggctgaggcttctccgagatcgg
aatgaaggagagagaagaagaggaaaggacacgacgactgttccaagcctgagcaccgctaccaaggacaccttcg
acgctctgcatatgcaagccctgcctccttagg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="75">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>458</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_mol type>AA</INSDSeq_mol type>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..458</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q72">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAK
HYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAALDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF
FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</IN
SDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="76">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1374</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1374</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q73">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gatatacagatgacccaaacgacgtctagcctcagtgcgctcactcggggatcgggtgacaat
tagctgcagggttagccaggatatttcaaaatatcttaactgggtatcaacaaaagccagatggaaccgtaaaactgctca
tataccacaccagtcgcctgcattcaggggttccgagccgcttttctgggagcggtagcgggaactgattatagcttgaca
ataagcaacctcgagcaggaagacattgcgacgtacttctgtcagcaagggaaacacgctgccgtataccttcggtggcgg
cactaaactggaaatcacgggatctacgtctggatccggaaaacctggatctggtgaaggatccactaaaggcgaagtca
agttgcaagagtctggacctggtctcgtggcaccttcacagtcactctccgttacctgtaccgtatctggagtttactt
cccgactatggcgtgtcatggatacggcaaccaccgcgaaaaggcttgaatggctgggcgttatctggggatccgaaac
cacatacactctgcgctcaagtcacggctgactattataaaggacaattcaaagagccaagtgttctgaaaatga
acagcctgcagactgatgacactgcaatatattactgcgccaagcattactattacggcggatcttacgcgatggattat
tggggccagggcacctctgtaacagtcagctccgcgcccgcatggacaatgaaaaatccaatggcacaataattcatgt
aaaggcacaacacttgtgtcctagcccactcttcttggtccgctctaaaccgttttgggtgctcgttgtggttggaggcg
tcttggttgttactctctgttggtagctgtagcctttataatattctgggttagaagcaaacgaagtaggcttttacat
tcagactatatgaacatgacaccaagacgccccggccccacaagaaaacactatcagccctatgctccgcctcgggactt
cgctgcttaccgaagcagagttaagttcagcaggagcggcagcgcacctgcttaccacaagggcagaatcaactgtaca
acgagctgaacctgggcagacgggaggaaacgatgtgctggacaagaggagaggcagagaccccgagatgggcggcaaa
cctagaagaagaacccccaggaggcctgtataatgagctccagaaggataagatggccgaggcctacagcgagatcgg
catgaaggcgcaagaagaagaggcaaggccacgacggcctctaccagggttaagcacagctactaaggacacctacg
acgcctgcacatgcaagctctgccccctaga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>45</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q74">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD</INSDSeq_sequence>
e>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="78">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q75">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

```

```

    <INSDSeq_sequence>IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 79" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>150</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..150</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q76">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>aagaaccgcaaagcaaaggcaaaacccgtcacacgaggagcgggcgccagggggacgacaacg
cggtcagaataaggaacgcccgcctccagtaccaaattccagattatgaaccaattcgggaagggacaacgcgatctctact
ccgtctc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 80" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>165</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..165</INSDFeature_location>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q77">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aagaaccgcaaagcaaaggcaaaacccgtcacacgaggagcggggcgcagggggacgacaacg
cggtcagaataaggaacgcccgcctccagtaccaaattccagattatgaaccaattcgggaagggacaacgcgatctctact
ccggtctcaatcagaagcgaatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="81">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>165</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..165</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q78">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aagaaccgcaaagcaaaggcaaaacccgtcacacgaggagcggggcgcagggggacgacaacg
cggtcagaataaggaacgcccgcctccagtaccaaattccagattatgaaccaattcgggaagggacaacgcgatctctaca
acggtctcaatcagaagcgaatt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 82" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>336</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..336</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q79">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cgggtgaagttctcaagaagcgtgacgctcctgcttaccaacaaggccaaaaccaactgta
caacgagctgaacctgggaagaagagaggaatacagacgtcctggacaagagaagaggaagagaccctgagatgggaggaa
agccaagaagaagaaccctcaagagggcctgtttaacgagctgcaaaaggacaagatggctgaggctttctccgagatc
ggaatgaaggagagagaagaagaggaaaggacacgacgactgttccaaggcctgagcaccgctaccaaggacacctt
cgacgctctgcacatgcaagccctgcctcctagg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 83" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>135</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>

```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..135</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q80">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggacacgaaacaggcagacttttctggcgccgctgatacacaggccctgctgagaaacgacca
ggtgtaccagcctctgagagacagagatgacgcccagtactctcacctcggcggcaattgggccagaaacaag</INSDS
eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="84">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>135</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..135</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q81">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggacaggatggcgctcagacagagcagagccagcgacaagcaaaccctgctgcctaacgacca
gctgtaccagcctctgaaggacagagaggacgaccagtacagccatctgcagggcaaccagctgcggagaaac</INSDS
eq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 85" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>156</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..156</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q82">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>tacttcctgggcagactggtgcctagaggaagaggagctgctgaggctgctaccagaaagca
gagaatcaccgagaccgagagcccttaccaggagctgcagggacagagaagcgacgtgtacagcgacctgaacaccaga
gacctactacaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 86" >

```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>336</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..336</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q83">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>agagttaagttcagcaggagcgcggcagcacctgcctaccaacaagggcagaatcaactgta
caacgagctgaacctgggcagacgggaggaatacgaatgtgctggacaagaggagaggcagagaccccgagatgggaggca
aacctagaagaagaacccccaggaggcctgtataatgagctccagaaggataagatggccgaggcctacagcgagatc
ggcatgaaggcgaaagaagaagaggcaagggccacgacggcctctaccaggccttaagcacagctactaaggacaccta
cgagccctgcacatgcaagctctgccccctaga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="87">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>50</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..50</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q84">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGL</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="88">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>55</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..55</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q85">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGLNQKRI</INSDS
eq_sequence>

```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 89" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>55</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..55</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q86">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPPVPNPDYEPTRKQGRDLYNGLNQKRI</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 90" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1266</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1266</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q87">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggcacttccagtcaccgcactcttgcttccactggccttggttgcctgcatgctgcgcggcc
agatatacagatgacccaacgacgtctagcctcagtcgctcactcggggatcgggtgacaattagctgcagggctagcc
aggatatttcaaaatatcttaactggtatcaacaaaagccagatggaaccgtaaaactgctcatataccacaccagtcgc
ctgcattcaggggttccgagccgcttttctgggagcggtagcggaaactgattatagcttgacaataagcaacctcgagca
ggaagacattgcgacgtacttctgtcagcaagggaacacgctgccgtataaccttcggtggcggcactaaactggaaatca
cgggatctacgtctggatccgaaaacctggatctggtgaaggatccactaaaggcgaagtcaagttgcaagagtctgga
cctggtctcgtggcaccttcacagtcactctccgttacctgtaccgtatctggagtttcaactcccgactatggcgtgtc
atggatacgccaaccaccgcgaaaaggtcttgaatggctgggcggttatctggggatccgaaaccacatactacaactctg
cgctcaagtcacggctgactattataaaggacaattcaaagagccaagtgttcttgaanaatgaacagcctgcagactgat
gacactgcaatatattactgcgccaagcattactattacggcggatcttacgcgatggattattggggccagggcacctc
tghtaacagtcagctccgcccgcattggacaatgaaaaatccaatggcacaataattcatgtaaagggcaaacacttgt
gtcctagcccactctttctggtccgtctaaaccgttttgggtgctcgttgtggttggaggcgtcctggcttggtactct
ctgttggtgactgtagcctttataatattctgggttagaagcaaacgaagtaggcttttacattcagactatatgaacat
gacaccaagacgccccggccccacaagaaaactatcagccc tatgctccgcctcgggacttcgctgcttaccgaagca
agaaccgcaaagcaaaggcaaacccgtcacacgaggagcgggcgcagggggacgacaacgcggtcagaataaggaacgc
ccgctccagtagcaaatccagattatgaaccaattcggaagggacaacgcgatctctactccggtctcaatcagaggcg
aatt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="91">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1437</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1437</INSDFeature_location>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q88">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggctctgcctgtgaccgctctgctgttgccccttgctttactcctgcacgccgcaagacc
cgacatccaaatgacccaaccacctcctccctgagcgcctcccttggagaccgagttaccatctcctgccgagcttctc
aagacatctccaagtacttgaattggtatcaacaaaagccccgacggaaccgtgaagctgctgatctaccacacatcccgg
ctgcactctggcgttccctcaagattctccggctctggaagcggaaaccgactactccctgaccatctccaacctggagca
agaggacatcgctacctacttctgccaacaaggcaacacctgccttacaccttcggaggaggaaccaagctggagatca
ccggaagcacaagcggatctggcaagcctggaagcggagaggggaagcaccaagggagaggtgaagctgcaagagagcggga
cctggattggtggccccctcacaatccctgagcgttacatgcactgtgagcggcgtgtcccttctgactacggcgttctc
ctggatccgccaacctccaagaaaggactggagtggctgggagtgatctggggaagcagaccacctactacaactccg
ccctgaagagccgactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtgttccctgaagatgaactctctccaaaccgac
gacaccgctatctactactgcgctaagcactactactacggaggaagctacgctatggactactggggacaaggcacctc
tgtgaccgtctcctctgccgccgctctggacaacgagaagagcaacggaaccatcatccacgtgaagggaaagcacctgt
gcccctctcctctgttccctggaccctccaagccttcttggtgctcgtggtggtgggaggagtgtggcttctactcc
ctgcttgtgaccgtggcttctcatctctctgggttagaagcaagagaagcagactgctgcacagcgcactacatgaacat
gaccctagaaggcccggacctaccagaaagcactaccagccttacgctcctcctagagacttcgctgcttacagaagca
gggtgaagtctcaagaagcgtgacgctcctgcttaccaacaaggccaaaaccaactgtacaacgagctgaacctggga
agaagagaggaatacgacgtcctggacaagagaagaggaagagaccctgagatgggaggaaagccaagaagaaagaacc
tcaagagggcctgtacaacgagctgcaaaaggacaagatggctgaggcttactccgagatcggaatgaagggagagagaa
gaagaggaaaggacacgacggactgtaccaaggcctgagcaccgctaccaaggacacctacgacgctctgcacatgcaa
gccctgcctcctagg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="92">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>50</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..50</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q89">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q90">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>6..10</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q91">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>11..15</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q92">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>16..20</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q93">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>21..25</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q94">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>

```

```
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>26..30</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q95">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>31..35</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q96">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>36..40</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q97">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>41..45</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q98">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>46..50</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q99">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>This region may encompass 1-5 repeating
residues</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>此區可涵蓋1至5個重複殘基
</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGGGGSSSSSGGGGGSSSSSGGGGGSSSSSGGGGGSSSSSGGGGGSSSSS</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="93">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>41</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..41</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q100">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="94">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q101">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL
QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="95">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q102">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

**【發明申請專利範圍】**

【請求項1】 一種抗CD19嵌合抗原受體(CAR)，其包含：

抗 CD19 結合域，其具有 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3 三者；及 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3，其中

該 HCDR1 包含根據 SEQ ID NO: 2 至 4 中任一者之胺基酸序列；該 HCDR2 包含根據 SEQ ID NO: 5 至 7 中任一者之胺基酸序列；該 HCDR3 包含根據 SEQ ID NO: 8 至 10 中任一者之胺基酸序列；該 LCDR1 包含根據 SEQ ID NO: 12 至 14 中任一者之胺基酸序列；該 LCDR2 包含根據 SEQ ID NO: 15 至 17 中任一者之胺基酸序列；及該 LCDR3 包含根據 SEQ ID NO: 18 至 20 中任一者之胺基酸序列，或

其中該 HCDR1 包含根據 SEQ ID NO: 24 至 26 中任一者之胺基酸序列；該 HCDR2 包含根據 SEQ ID NO: 27 至 29 中任一者之胺基酸序列；該 HCDR3 包含根據 SEQ ID NO: 30 至 32 中任一者之胺基酸序列；該 LCDR1 包含根據 SEQ ID NO: 34 至 36 中任一者之胺基酸序列；該 LCDR2 包含根據 SEQ ID NO: 37 至 39 中任一者之胺基酸序列；及該 LCDR3 包含根據 SEQ ID NO: 40 至 42 中任一者之胺基酸序列；

跨膜域；

共刺激域；及

信號傳導域，其包含 CD3 $\epsilon$  信號傳導域、CD3 $\gamma$  信號傳導域、CD3 $\delta$  信號傳導域或 DAP12 信號傳導域中之一者。

【請求項2】 如請求項1之抗CD19 CAR，其包含重鏈可變域，該重鏈可變域包含該HCDR1、該HCDR2及該HCDR3；及第一輕鏈可變域，該第一輕鏈可變域包含該LCDR1、該LCDR2及該LCDR3，其中：

該重鏈可變域與 SEQ ID NO: 1 至少 80%同一；及

該輕鏈可變域與 SEE ID NO: 11 至少 80%同一，或

該重鏈可變域與 SEQ ID NO: 24 至少 80%同一；及

該輕鏈可變域與 SEE ID NO: 33 至少 80%同一。

【請求項3】 如請求項1或2中任一項之抗CD19 CAR，其中該HCDR1、該HCDR2、該HCDR3；該LCDR1、該LCDR2及該LCDR3係由單一多肽構成。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項之抗CD19 CAR，其中該抗CD19結合域包含scFv。

【請求項5】 如請求項4之抗CD19 CAR，其中該scFv包含根據SEQ ID NO: 21或43中之一者之胺基酸序列。

【請求項6】 如請求項1至5中任一項之抗CD19 CAR，其中該信號傳導域包含具有根據SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的CD3 $\epsilon$ 信號傳導域。

【請求項7】 如請求項1至5中任一項之抗CD19 CAR，其中該信號傳導域包含具有根據SEQ ID NO: 57之胺基酸序列的CD3 $\gamma$ 信號傳導域。

【請求項8】 如請求項1至5中任一項之抗CD19 CAR，其中該信號傳導域包含具有根據SEQ ID NO: 55之胺基酸序列的CD3 $\delta$ 信號傳導域。

【請求項9】 如請求項1至5中任一項之抗CD19 CAR，其中該信號傳導域包含具有根據SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的DAP12信號傳導域。

【請求項10】如請求項1至9中任一項之抗CD19 CAR，其中該跨膜域包含CD28跨膜域。

【請求項11】如請求項1至10中任一項之抗CD19 CAR，其中該共刺激域包含CD28共刺激域。

【請求項12】如請求項1至11中任一項之抗CD19 CAR，其包含根據SEQ ID NO: 62、65、67及69中任一者之胺基酸序列。

【請求項13】一種核酸，其編碼如請求項1至12中任一項之抗CD19 CAR。

【請求項14】一種重組載體，其包含如請求項13之核酸。

【請求項15】一種宿主細胞，其經如請求項13之核酸或請求項14之重組載體轉導。

【請求項16】如請求項15之宿主細胞，其中該宿主細胞包含T細胞、iNKT細胞或NK細胞。

【請求項17】一種醫藥組成物，其包含如請求項15或16之宿主細胞。

【請求項18】一種如請求項15或16之宿主細胞或如請求項17之醫藥組成物之用途，其係用於製備治療有需要之患者之疾病的醫藥品。

【請求項19】一種如請求項15或16之宿主細胞或如請求項17之醫藥組成物之用途，其係用於製備在對象中誘導免疫反應或使對象針對癌症免疫之醫藥品。

【請求項20】如請求項19之用途，其中該癌症係急性淋巴母細胞白血病(ALL)（包括非T細胞ALL）、急性骨髓白血病(acute myeloid leukemia)、B細胞前淋巴球白血病、B細胞急性淋巴樣白血病(“BALL”)、母細胞性漿細胞樣樹突細胞贅瘤、Burkitt氏淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病

(chronic myelogenous leukemia, CML)、慢性骨髓白血病(chronic myeloid leukemia)、慢性或急性白血病、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡淋巴瘤(FL)、毛細胞白血病、霍奇金氏病、惡性淋巴增生病況、MALT淋巴瘤、被套細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、意義不明單株免疫球蛋白增高症(MGUS)、多發性骨髓瘤、骨髓化生不良及骨髓化生不良症候群、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、漿細胞增生性病(包括無症狀骨髓瘤(燜燃型多發性骨髓瘤或無痛骨髓瘤))、漿母細胞淋巴瘤、漿細胞樣樹突細胞贅瘤、漿細胞瘤(包括漿細胞惡液質；孤立性骨髓瘤；孤立性漿細胞瘤；髓外漿細胞瘤；及多發性漿細胞瘤)、POEMS症候群(亦稱為Crow-Fukase氏症候群；Takatsuki氏症；及PEP症候群)、原發性縱膈腔大B細胞淋巴瘤(PMBC)、小細胞或大細胞濾泡淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤(SMZL)、全身性類澱粉蛋白輕鏈類澱粉變性症、T細胞急性淋巴樣白血病("TALL")、T細胞淋巴瘤、變化型濾泡淋巴瘤、或Waldenstrom氏巨球蛋白血症、被套細胞淋巴瘤(MCL)、變化型濾泡淋巴瘤(TFL)、原發性縱膈腔B細胞淋巴瘤(PMBCL)、多發性骨髓瘤、毛細胞淋巴瘤/白血病或其組合。

**【請求項21】** 一種嵌合抗原受體(CAR)，其包含CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域具有選自SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88及SEQ ID NO: 89所組成之群組的胺基酸序列。

**【請求項22】** 如請求項21之CAR，其中該CAR包含結合域，該結合域特異性至選自由下列所組成之群組的抗原：707-AP(707丙胺酸脯胺酸)、AFP( $\alpha$ (a)-胎兒蛋白)、ART-4(由T4細胞識別之腺癌抗原)、BAGE(B抗原；b-連環蛋白(b-catenin)/m、b-連環蛋白/突變的)、BCMA(B細胞成熟抗原)、Bcr-abl(斷點簇區-Abelson)、CAIX(碳酸酐酶IX)、CD19(分化簇19)、CD20

(分化簇20)、CD22(分化簇22)、CD30(分化簇30)、CD33(分化簇33)、CD44v7/8(分化簇44,外顯子7/8)、CAMEL(黑色素瘤上由CTL識別之抗原)、CAP-1(癌胚抗原肽-1)、CASP-8(凋亡蛋白酶-8)、CDC27m(突變之細胞分裂週期27)、CDK4/m(突變之週期蛋白依賴型激酶4)、CEA(癌胚抗原)、類C型凝集素-1(CLL-1)、CT(癌症/睪丸(抗原))、Cyp-B(親環素B)、DAM(分化抗原黑色素瘤)、EGFR(表皮生長因子受體)、EGFRvIII(表皮生長因子受體變體III)、EGP-2(表皮醣蛋白2)、EGP-40(表皮醣蛋白40)、Erb2、3、4(紅血球母細胞性白血病毒致癌基因同源物-2、-3、4)、ELF2M(突變之延伸因子2)、ETV6-AML1(Ets變體基因6/急性骨髓性白血病1基因ETS)、FBP(葉酸結合蛋白)、fAchR(胎兒乙醯膽鹼受體)、G250(醣蛋白250)、GAGE(G抗原)、GD2(二唾液酸神經節苷脂(disialoganglioside)2)、GD3(二唾液酸神經節苷脂3)、磷脂肌醇聚醣3(GPC3)、GnT-V(N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶V)、Gp100(醣蛋白100kD)、HAGE(螺旋酶(helicase)抗原)、HER-2/neu(人表皮受體-2/神經性;亦稱為EGFR2)、HLA-A(人白血球抗原A)、HPV(人乳頭狀瘤病毒)、HSP70-2M(突變之熱休克蛋白70-2)、HST-2(人印戒腫瘤(signet ring tumor)-2)、hTERT或hTRT(人端粒酶反轉錄酶)、iCE(腸羧基酯酶)、IL-13R-a2(介白素-13受體次單元 $\alpha$ -2)、KIAA0205、KDR(激酶插入結構域受體)、 $\kappa$ 輕鏈、LAGE(L抗原)、LDLR/FUT(低密度脂質受體/GDP-L-岩藻糖:b-D-半乳糖苷酶2-a-L岩藻糖基轉移酶)、LeY(路易斯-Y抗體)、LICAM(L1細胞黏附分子)、MAGE(黑色素瘤抗原)、MAGE-A1(黑色素瘤相關抗原1)、間皮素(mesothelin)、鼠CMV感染之細胞、MART-1/Melan-A(由T細胞識別之黑色

素瘤抗原-1/黑色素瘤抗原A)、MC1R(黑皮質素1受體)、肌球蛋白/m(突變之肌球蛋白)、MUC1(黏蛋白1)、MUM-1、MUM-2、MUM-3(突變之黑色素瘤泛蛋白1、2、3)、NA88-A(患者M88之NA cDNA選殖株)、NKG2D(天然殺手細胞2族,成員D)配體、NY-BR-1(紐約乳房分化抗原1)、NY-ESO-1(紐約食道鱗狀細胞癌-1)、致癌胎兒抗原(h5T4)、P15(蛋白15)、p190次要bcr-ab1(190KD bcr-ab1蛋白質)、Pml/RARa(前髓細胞性白血病/視黃酸受體a)、PRAME(優先表現之黑色素瘤抗原)、PSA(前列腺特異性抗原)、PSCA(前列腺幹細胞抗原)、PSMA(前列腺特異性膜抗原)、RAGE(腎抗原)、RU1或RU2(腎泛蛋白1或2)、SAGE(肉瘤抗原)、SART-1或SART-3(鱗狀抗原排斥腫瘤1或3)、SSX1、SSX2、SSX3、SSX4(滑膜肉瘤X1、X2、X3、X4)、TAA(腫瘤相關抗原)、TAG-72(腫瘤相關糖蛋白72)、TEL/AML1(轉位Ets家族性白血病/急性骨髓性白血病1)、TPI/m(突變之磷酸丙糖(triosephosphate)異構酶)、TRP-1(酪胺酸酶相關性蛋白1或gp75)、TRP-2(酪胺酸酶相關性蛋白2)、TRP-2/INT2(TRP-2/內含子2)、VEGF-R2(血管內皮生長因子受體2)及WT1(威爾姆氏腫瘤(Wilm's tumor)基因)。

**【請求項23】** 如請求項21之CAR,其中該CAR由雙順反子核酸構築體編碼。

**【請求項24】** 如請求項21至23中任一項之CAR,其中該CAR包含特異性至CD19之結合域。

【請求項25】 如請求項21之CAR，其中該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域係由核酸編碼，該核酸與選自由SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80及SEQ ID NO: 81所組成之群組的序列具有至少90%序列同一性。

【請求項26】 如請求項21之CAR，其中當該CAR在細胞中表現時，該CAR代替CD3 $\epsilon$ 信號傳導域展現出比具有野生型CD3 $\epsilon$ 信號傳導域之相應CAR更高程度的向細胞膜運輸，該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域具有選自由SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88及SEQ ID NO: 89所組成之群組的胺基酸序列。

【請求項27】 一種多核苷酸，其編碼如請求項21之CAR。

【請求項28】 一種載體，其包含如請求項27之多核苷酸。

【請求項29】 一種宿主細胞，其包含如請求項28之載體。

【請求項30】 如請求項29之宿主細胞，其中該細胞係選自由以下所組成之群組：T細胞、iNKT細胞或NK細胞。

【請求項31】 一種醫藥組成物，其包含如請求項29或30之宿主細胞。

【請求項32】 一種如請求項29或30之宿主細胞之用途，其係用於製備治療有需要之患者中之疾病或病況的醫藥品。

【請求項33】 一種製造CAR T細胞之方法，其包含提供如請求項21之CAR之表現。

【請求項34】 一種CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，其具有選自SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88及SEQ ID NO: 89所組成之群組的胺基酸序列。

【請求項35】 如請求項34之CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，其中該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域係由核酸編碼，該核酸與選自由SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80及SEQ ID NO: 81所組成之群組的序列具有至少90%序列同一性。

【請求項36】如請求項34之CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，其中該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域係由嵌合抗原受體(CAR)構成。

【請求項37】如請求項36之CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，其中該CAR包含結合域，該結合域特異性至選自由下列所組成之群組的抗原：707-AP（707丙胺酸脯胺酸）、AFP（ $\alpha$  (a)-胎兒蛋白）、ART-4（由T4細胞識別之腺癌抗原）、BAGE（B抗原；b-連環蛋白(b-catenin)/m、b-連環蛋白/突變的）、BCMA（B細胞成熟抗原）、Bcr-abl（斷點簇區-Abelson）、CAIX（碳酸酐酶IX）、CD19（分化簇19）、CD20（分化簇20）、CD22（分化簇22）、CD30（分化簇30）、CD33（分化簇33）、CD44v7/8（分化簇44，外顯子7/8）、CAMEL（黑色素瘤上由CTL識別之抗原）、CAP-1（癌胚抗原肽-1）、CASP-8（凋亡蛋白酶-8）、CDC27m（突變之細胞分裂週期27）、CDK4/m（突變之週期蛋白依賴型激酶4）、CEA（癌胚抗原）、類C型凝集素-1 (CLL-1)、CT（癌症/睪丸（抗原））、Cyp-B（親環素B）、DAM（分化抗原黑色素瘤）、EGFR（表皮生長因子受體）、EGFRvIII（表皮生長因子受體變體III）、EGP-2（表皮醣蛋白2）、EGP-40（表皮醣蛋白40）、Erb2、3、4（紅血球母細胞性白血病病毒致癌基因同源物-2、-3、4）、ELF2M（突變之延伸因子2）、ETV6-AML1（Ets變體基因6/急性骨髓性白血病1基因ETS）、FBP（葉酸結合蛋白）、fAchR（胎兒乙醯膽鹼受體）、G250（醣蛋白250）、GAGE（G抗原）、GD2（二唾液酸神經節苷脂(disialoganglioside)2）、GD3（二唾液酸神經節苷脂3）、磷脂肌醇聚醣3 (GPC3)、GnT-V（N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶V）、Gp100（醣蛋白100kD）、HAGE（螺旋酶(helicase)抗原）、HER-2/neu（人表皮受體-2/神經性；亦稱為EGFR2）、HLA-A（人白血球抗原A）、HPV（人乳頭狀瘤病

毒)、HSP70-2M(突變之熱休克蛋白70-2)、HST-2(人印戒腫瘤(signet ring tumor)-2)、hTERT或hTRT(人端粒酶反轉錄酶)、iCE(腸羧基酯酶)、IL-13R-a2(介白素-13受體次單元 $\alpha$ -2)、KIAA0205、KDR(激酶插入結構域受體)、 $\kappa$ 輕鏈、LAGE(L抗原)、LDLR/FUT(低密度脂質受體/GDP-L-岩藻糖:b-D-半乳糖苷酶2-a-L岩藻糖基轉移酶)、LeY(路易斯-Y抗體)、L1CAM(L1細胞黏附分子)、MAGE(黑色素瘤抗原)、MAGE-A1(黑色素瘤相關抗原1)、間皮素(mesothelin)、鼠CMV感染之細胞、MART-1/Melan-A(由T細胞識別之黑色素瘤抗原-1/黑色素瘤抗原A)、MC1R(黑皮質素1受體)、肌球蛋白/m(突變之肌球蛋白)、MUC1(黏蛋白1)、MUM-1、MUM-2、MUM-3(突變之黑色素瘤泛蛋白1、2、3)、NA88-A(患者M88之NA cDNA選殖株)、NKG2D(天然殺手細胞2族,成員D)配體、NY-BR-1(紐約乳房分化抗原1)、NY-ESO-1(紐約食道鱗狀細胞癌-1)、致癌胎兒抗原(h5T4)、P15(蛋白15)、p190次要bcr-ab1(190KD bcr-ab1蛋白質)、Pml/RARa(前髓細胞性白血病/視黃酸受體a)、PRAME(優先表現之黑色素瘤抗原)、PSA(前列腺特異性抗原)、PSCA(前列腺幹細胞抗原)、PSMA(前列腺特異性膜抗原)、RAGE(腎抗原)、RU1或RU2(腎泛蛋白1或2)、SAGE(肉瘤抗原)、SART-1或SART-3(鱗狀抗原排斥腫瘤1或3)、SSX1、SSX2、SSX3、SSX4(滑膜肉瘤X1、X2、X3、X4)、TAA(腫瘤相關抗原)、TAG-72(腫瘤相關糖蛋白72)、TEL/AML1(轉位Ets家族性白血病/急性骨髓性白血病1)、TPI/m(突變之磷酸丙糖(triosephosphate)異構酶)、TRP-1(酪胺酸酶相關性蛋白1或gp75)、TRP-2(酪胺酸酶相關性蛋白2)、

TRP-2/INT2 (TRP-2/內含子2)、VEGF-R2 (血管內皮生長因子受體2) 及WT1 (威爾姆氏腫瘤(Wilm's tumor)基因)。

【請求項38】 如請求項36之CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，其中該CAR由雙順反子核酸構築體編碼。

【請求項39】 如請求項36至38中任一項之CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，其中該CAR包含特異性至CD19之結合域。

【請求項40】 如請求項36之CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，其中當該CAR在細胞中表現時，相較於具有野生型CD3 $\epsilon$ 信號傳導域代替CD3 $\epsilon$ 信號域之相應CAR，該CAR展現更高程度的向細胞膜運輸，該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域具有選自由SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88及SEQ ID NO: 89所組成之群組的胺基酸序列。

【請求項41】 一種多核苷酸，其編碼如請求項34之CD3 $\epsilon$ 信號傳導域。

【請求項42】 一種載體，其包含如請求項41之多核苷酸。

【請求項43】 一種宿主細胞，其包含如請求項42之載體。

【請求項44】 如請求項43之宿主細胞，其中該細胞係選自由以下所組成之群組：T細胞、iNKT細胞或NK細胞。

【請求項45】 一種如請求項43或44之宿主細胞之用途，其係用於製備治療有需要之患者中之疾病或病況的醫藥品。

【請求項46】 一種醫藥組成物，其包含如請求項43或44之宿主細胞。

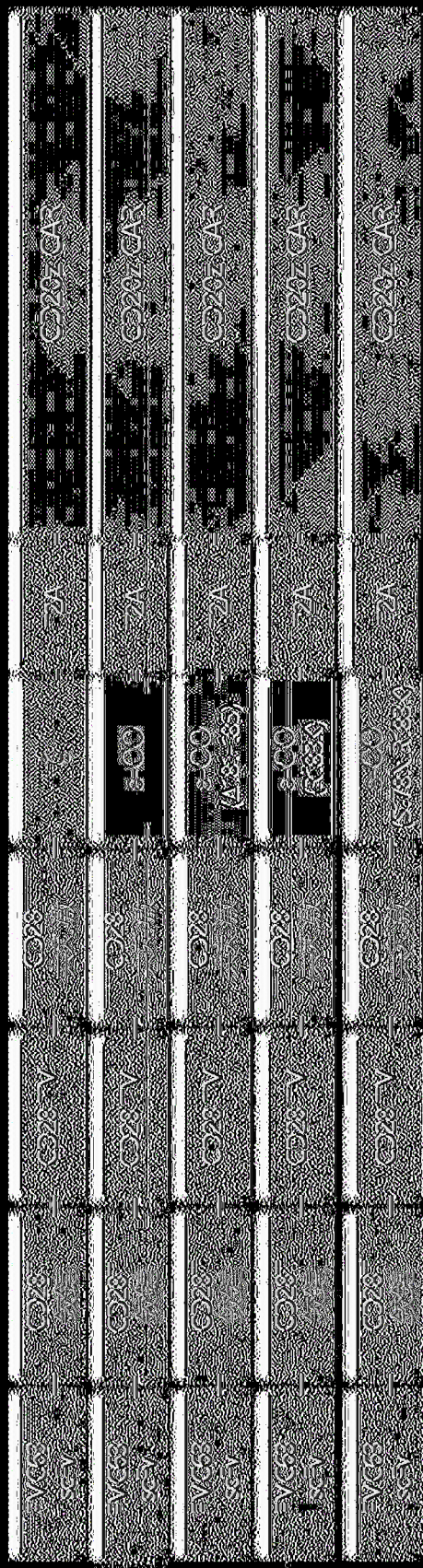
【請求項47】 一種製造CAR T細胞之方法，其包含提供如請求項36之CAR之表現。

【請求項48】 一種改善CAR向細胞膜運輸之方法，其中該CAR經設計以表現CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域具有選自SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88及SEQ ID NO: 89所組成之群組的胺基酸序列。

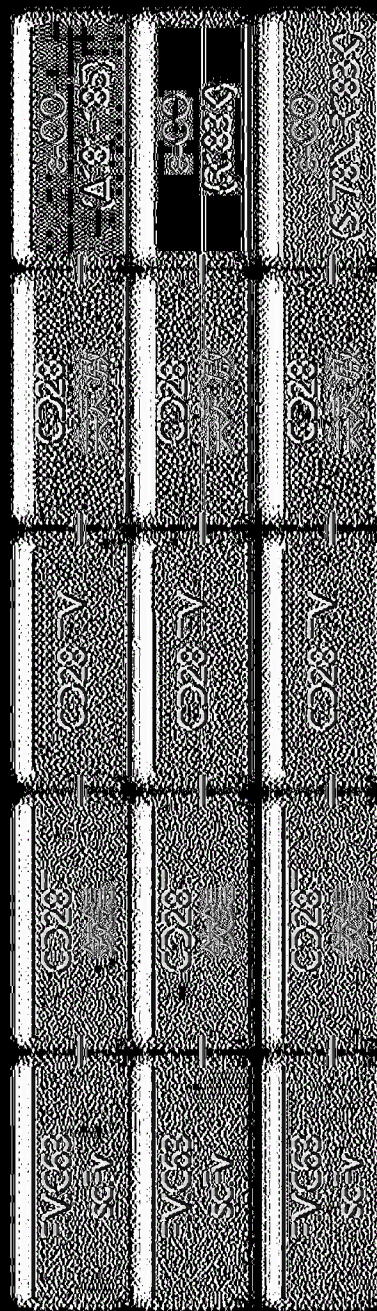
【請求項49】 如請求項48之方法，其中該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域係由核酸編碼，該核酸與選自由SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80及SEQ ID NO: 81所組成之群組的序列具有至少90%序列同一性。

【請求項50】 一種改善CAR向細胞膜運輸之方法，其中該CAR經設計以包含CD3 $\epsilon$ 信號傳導域，該CD3 $\epsilon$ 信號傳導域具有一或多個突變、缺失或插入至野生型CD3 $\epsilon$ 信號傳導域。

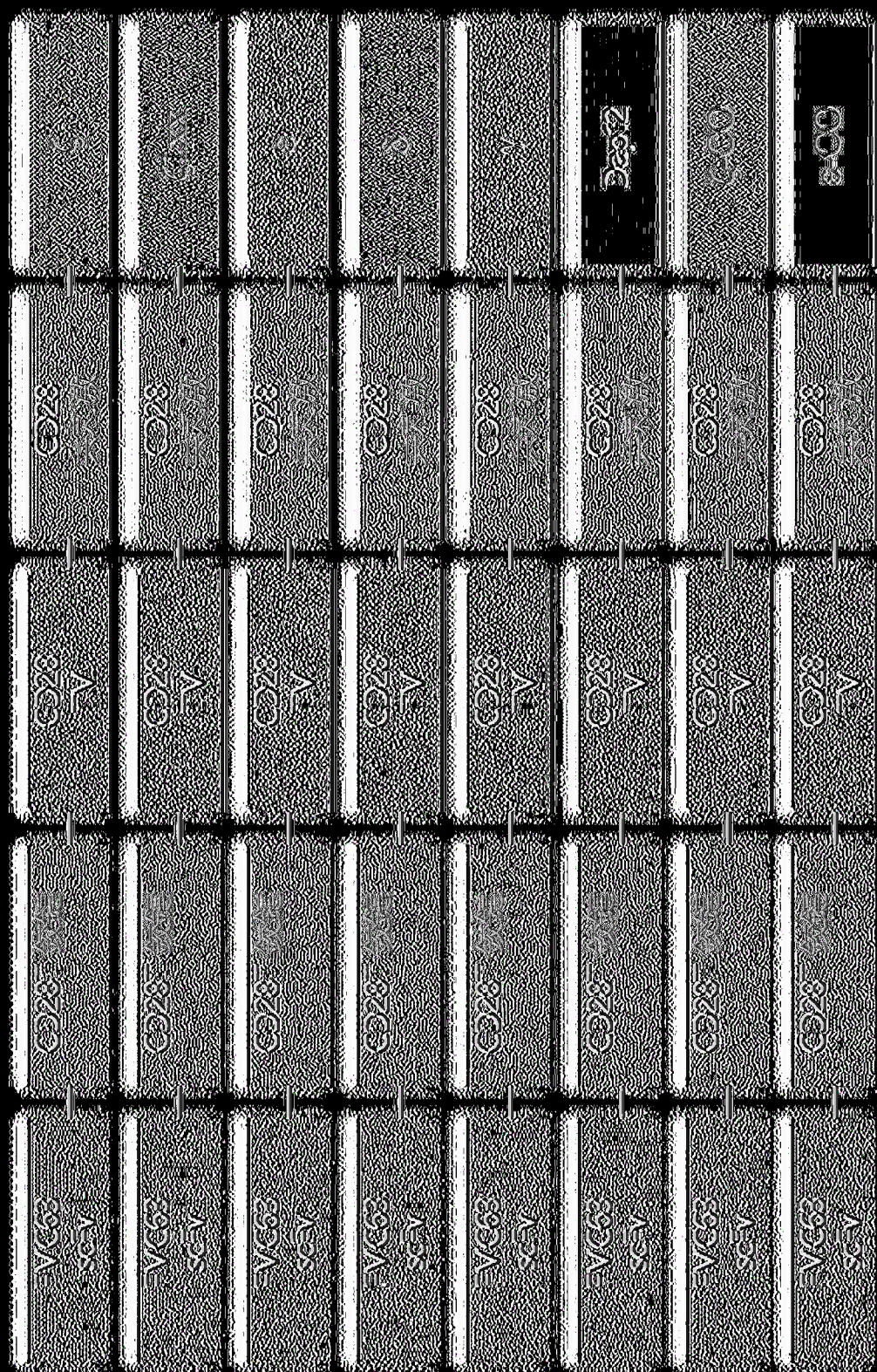
(發明圖式)



(圖1)



(圖2)



(圖3)