



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105814083 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201480064779.1

(22)申请日 2014.10.15

(30)优先权数据

61/891,347 2013.10.15 US

61/895,704 2013.10.25 US

62/009,056 2014.06.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/060713 2014.10.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/057852 EN 2015.04.23

(71)申请人 加州生物医学研究所

地址 美国加利福尼亚州

申请人 斯克利普斯研究所

(72)发明人 金灿赫 特拉维斯·杨 曹宇

詹尼弗·玛 金玫秀

斯蒂芬妮·皮克尔顿

彼得·G·舒尔茨

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

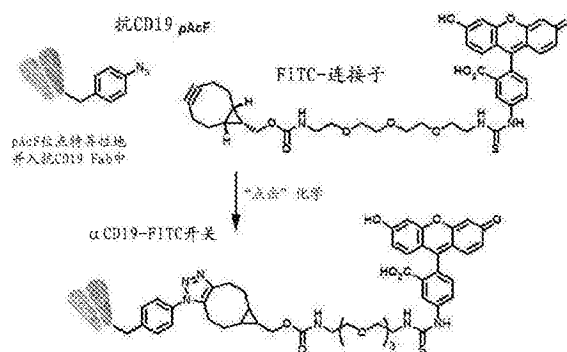
权利要求书3页 说明书138页 附图23页

(54)发明名称

嵌合抗原受体T细胞开关和其用途

(57)摘要

本文公开了用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关。开关一般包含嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)和标靶相互作用域(TID)。开关可以进一步包含连接子。本文进一步公开了使用开关治疗有需要的受试者的一种或多种病状或疾病的方法。



1. 一种用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关,所述开关包含:
 - a. 与所述CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及
 - b. 包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID),其中所述TID与标靶细胞上的表面分子相互作用。
2. 如权利要求1所述的开关,其中所述CAR-ID附接至所述TID。
3. 如权利要求1所述的开关,其中所述CAR-ID经由所述非天然氨基酸附接至所述TID。
4. 如权利要求1所述的开关,其中所述CAR-ID位点特异性地附接至所述TID的所述非天然氨基酸。
5. 如权利要求1所述的开关,其进一步包含连接子。
6. 如权利要求5所述的开关,其中所述连接子使所述CAR-ID附接至所述TID。
7. 如权利要求5所述的开关,其中所述连接子使所述CAR-ID经由所述非天然氨基酸附接至所述TID。
8. 如权利要求5所述的开关,其中所述连接子使所述CAR-ID位点特异性地附接至所述TID的所述非天然氨基酸。
9. 如权利要求5所述的开关,其中所述连接子在一个或多个末端处包含氨氧基、叠氮基、环辛炔基或其组合。
10. 如权利要求1所述的开关,其中所述CAR-ID包含小分子。
11. 如权利要求10所述的开关,其中所述小分子是半抗原。
12. 如权利要求10所述的开关,其中所述小分子是异硫氰酸荧光素(FITC)。
13. 如权利要求12所述的开关,其中所述TID偶联至FITC的异硫氰酸酯。
14. 如权利要求12所述的开关,其进一步包含偶联至FITC的异硫氰酸酯的连接子。
15. 如权利要求10所述的开关,其中所述小分子是生物素。
16. 如权利要求1所述的开关,其中所述TID是基于或来源于抗体的至少一部分。
17. 如权利要求1所述的开关,其中所述TID是基于或来源于单链可变片段(scFv)的至少一部分。
18. 如权利要求1所述的开关,其中所述TID是基于或来源于抗CD19抗体的至少一部分。
19. 如权利要求1所述的开关,其中所述TID是基于或来源于抗CD19抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。
20. 如权利要求1所述的开关,其中所述TID是基于或来源于选自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的至少一部分。
21. 如权利要求1所述的开关,其中所述TID是基于或来源于选自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。
22. 如权利要求16所述的开关,其中所述非天然氨基酸插入所述TID基于或来源于的所述抗体的所述部分中。
23. 如权利要求16所述的开关,其中所述非天然氨基酸置换所述TID基于或来源于的所述抗体的氨基酸。
24. 一种包含用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的多个开关的组合物,其中所

述多个开关的开关包含(a)与所述CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)与标靶细胞上的表面分子相互作用的标靶相互作用域(TID),其中至少约60%的所述开关是结构上同源的。

25.如权利要求24所述的组合物,其中至少约80%的所述开关是结构上同源的。

26.一种包含用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的多个开关的组合物,其中所述多个开关的开关包含(a)与所述CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含多肽的标靶相互作用域(TID),其中所述CAR-ID附接至至少60%的所述开关中的所述TID中的相同预定位点。

27.如权利要求26所述的组合物,其中所述CAR-ID附接至至少约80%的所述开关中的所述TID中的相同预定位点。

28.如权利要求24或26所述的组合物,其中所述CAR-ID包含小分子。

29.如权利要求28所述的组合物,其中所述小分子是异硫氰酸荧光素(FITC)。

30.如权利要求24或26所述的组合物,其中所述TID包含小分子。

31.如权利要求30所述的组合物,其中所述小分子选自由2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸、叶酸盐或其衍生物组成的群组。

32.如权利要求24或26所述的组合物,其中所述多个开关的所述开关进一步包含连接子。

33.如权利要求32所述的组合物,其中所述连接子使所述CAR-ID附接至所述TID。

34.如权利要求26所述的组合物,其中所述TID中的所述预定位点是氨基酸残基。

35.如权利要求34所述的组合物,其中所述氨基酸残基是非天然氨基酸。

36.一种用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关中间物,所述开关中间物包含:

a.包含小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID),其中所述CAR-ID与所述CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用;以及

b.连接至所述CAR-ID的连接子,其中所述连接子不包含与所述CAR-EC相互作用的区域并且所述连接子不包含与标靶细胞上的表面分子相互作用的区域。

37.如权利要求36所述的开关中间物,其中所述连接子包含环辛炔。

38.如权利要求36所述的开关中间物,其中所述连接子是PEG-环辛炔连接子。

39.如权利要求36所述的开关中间物,其中所述连接子包含三唑。

40.如权利要求39所述的开关中间物,其中所述三唑是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。

41.如权利要求36所述的开关中间物,其中所述CAR-ID包含异硫氰酸荧光素(FITC)。

42.一种用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关中间物,所述开关中间物包含:

a.包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID),其中所述TID与标靶细胞上的表面分子相互作用;以及

b.连接至所述TID的连接子,其中所述连接子不包含直接与所述CAR-EC相互作用的区域并且所述连接子不包含直接与所述标靶细胞相互作用的区域。

43.如权利要求36或42所述的开关中间物,其中所述连接子是双功能连接子。

44.如权利要求36或42所述的开关中间物,其中所述连接子是异双功能连接子。

45. 如权利要求36或42所述的开关中间物,其中所述连接子包含聚乙二醇(PEG)。
46. 如权利要求42所述的开关中间物,其中所述连接子在一端处包含叠氮。
47. 如权利要求42所述的开关中间物,其中所述连接子在一端处包含氨基。
48. 如权利要求42所述的开关中间物,其中所述连接子是叠氮-PEG-氨基连接子。
49. 如权利要求42所述的开关中间物,其中所述连接子经由肟接合附接至所述TID。
50. 如权利要求42所述的开关中间物,其中所述TID是基于或来源于抗体或抗体片段。
51. 如权利要求42所述的开关中间物,其中所述TID包含一个或多个非天然氨基酸。
52. 一种产生包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)标靶相互作用域(TID)的开关的方法,所述方法包括:
- a. 使第一连接子偶合至所述TID以产生包含偶联至所述TID的所述第一连接子的第一开关中间物;
- b. 使所述第一开关中间物偶合至所述CAR-ID,从而产生所述开关。
53. 如权利要求52所述的方法,其进一步包括使第二连接子偶合至所述CAR-ID以产生包含偶联至所述CAR-ID的所述第二连接子的第二开关中间物。
54. 如权利要求53所述的方法,其中使所述第一开关中间物偶合至所述CAR-ID包括使所述第一开关中间物偶合至所述第二开关中间物。
55. 如权利要求53所述的方法,其中使所述第一连接子偶合至所述TID包括肟接合。
56. 如权利要求55所述的方法,其中所述第二连接子包含环辛炔。
57. 如权利要求56所述的方法,其中使所述第一开关中间物偶合至所述第二开关中间物包括环加成反应。
58. 如权利要求57所述的方法,其中所述第一连接子包含叠氮。
59. 如权利要求58所述的方法,其中所述环加成反应包括使所述第二连接子的所述环辛炔与所述第一连接子的所述叠氮反应。
60. 如权利要求57所述的方法,其中所述环加成反应包括[3+2]环加成反应。

嵌合抗原受体T细胞开关和其用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月15日提交的美国临时申请序列号61/891,347、2013年10月25日提交的美国临时申请序列号61/895,704、以及2014年6月6日提交的美国临时申请序列号62/009,056的权益,其全部以全文引用的方式并入。

背景技术

[0003] 免疫疗法一旦由诺贝尔奖得主Paul Ehrlich视为“魔弹”,即迅速成为化学疗法的有吸引力的替代物。具体地说,使用遗传修饰的T细胞“重教”免疫系统以识别并消除恶性肿瘤细胞的免疫疗法在早期临床试验中正产生激动人心的结果。这种基因疗法避开抗化学疗法的许多机制并且对复发性/难治性疾病具活性,这为治愈性疗法提供现实的希望。然而,基因疗法技术在临床中已经遭遇重大风险,包括慢性免疫失调并且甚至死亡。在改善的免疫疗法的研究中,我们已经确立了一种选择性地活化和灭活遗传修饰的T细胞的方法,这比在临床中当前测试的效应疗法更安全并且更通用。

[0004] 遗传工程改造的嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)的过继转移使免疫系统具备识别并消除肿瘤细胞的能力。这种疗法在慢性淋巴细胞白血病(CLL)和急性成淋巴细胞白血病(ALL)患者的临床试验中已经达成持续缓解,并且迅速成为化学疗法的强有力的替代物。尽管取得这些成就,但这种疗法受困于严重的安全隐患,这归因于CAR-T的持久活性,导致毒性淋巴细胞减少,和血液学标靶的慢性低丙种球蛋白血症,以及实体肿瘤标靶的致命性脱靶细胞溶解。

发明内容

[0005] 本文公开了嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)开关,其包含:(a)包含小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID)。CAR-ID可以与效应细胞上的嵌合抗原受体(CAR)相互作用。效应细胞可以是嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)。标靶相互作用域(TID)可以与标靶细胞上的表面分子相互作用。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地连接至TID。CAR-ID可以位点特异性地连接至TID的非天然氨基酸。TID可以包含抗体或抗体片段。抗体片段可以包含Fab。抗体或抗体片段可以包含免疫球蛋白的至少一部分。CAR-EC开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以使CAR-ID位点特异性地连接至TID。连接子可以使CAR-ID位点特异性地连接至TID的非天然氨基酸。连接子可以使CAR-ID经由一个或多个化学基团连接至TID。化学基团可以选自由肟、三唑、环辛炔、四嗪、环丙烯、降冰片烯、反式环辛烯以及硒代半胱氨酸组成的群组。化学基团可以在连接子与TID之间形成。替代地或另外,化学基团可以在连接子与CAR-ID之间形成。CAR-EC开关可以进一步包含一个或多个额外的连接子。一个或多个额外的连接子可以使额外的TID连接至CAR-ID。替代地或另外,一个或多个额外的连接子可以使额外的CAR-ID连接至TID。一个或多个额外的连接子可以偶联至TID。或者,一个或多个额外的连接子可以偶联至CAR-ID。一个或多个额外的连接子可以使CAR-ID连接至附接

于TID的连接子。连接子可以具有约25 Å的长度。连接子可以提供约2.5 Å至约100 Å的介于CAR-ID与TID之间的距离。CAR-ID可以是半抗原。CAR-ID可以包含FITC或其衍生物。CAR-ID可以选自DOTA、二硝基苯酚、生物素以及其衍生物。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。多肽可以基于或来源于抗体或其片段。非天然氨基酸可以置换多肽基于或来源于的抗体或片段的氨基酸残基。多肽可以基于或来源于抗体的轻链。非天然氨基酸可以置换多肽基于或来源于的抗体的轻链的氨基酸。举例来说,非天然氨基酸可以置换抗体轻链的丝氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的丝氨酸202或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的甘氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的甘氨酸68或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的苏氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的苏氨酸109或其同源物。多肽可以基于或来源于抗体的重链。非天然氨基酸可以置换抗体重链的赖氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的赖氨酸136或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丙氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丙氨酸123或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丝氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丝氨酸74或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的氨基酸残基和抗体重链的氨基酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的甘氨酸残基和抗体重链的氨基酸。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的甘氨酸残基和抗体重链的丝氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丝氨酸残基和抗体轻链的氨基酸残基。抗体轻链的甘氨酸残基可以是甘氨酸68或其同源物。抗体重链的丝氨酸残基可以是丝氨酸74或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的丝氨酸残基和抗体重链的氨基酸。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的丝氨酸残基和抗体重链的赖氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的赖氨酸残基和抗体轻链的氨基酸残基。抗体轻链的丝氨酸残基可以是丝氨酸202或其同源物。抗体重链的丝氨酸残基可以是赖氨酸136或其同源物。TID可以基于或来源于选自抗EGFRvIII抗体、抗CD33抗体、抗CLL-1抗体、抗CEA抗体、抗CD19抗体、抗BCMA抗体、抗CS1抗体以及其片段的抗体。TID可以选自抗EGFR抗体、抗Her2抗体以及其片段。CAR-ID可以包含FITC并且TID可以包含抗CD19抗体或其片段。CAR-ID可以包含FITC并且TID可以包含抗Her2抗体或其片段。CAR-ID可以包含FITC并且TID可以选自抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CLL1抗体、抗CD33抗体或其片段。TID可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸编码。TID可以由与SEQ ID NO:5-9中的任一者至少约70%一致的核苷酸序列编码。TID可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:10-17中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:18-56中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。标靶细胞可以是癌细胞。多个CAR-EC开关的纯度可以为至少约90%。多个CAR-EC开关的均质度可以为至少约90%。多个CAR-EC开关的结构均质度可以为至少约90%。

[0006] 本文进一步公开了CAR-EC开关,其包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)结合标靶上的表面分子的标靶相互作用域(TID),其中CAR-ID和TID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸。CAR-ID可以包含一个至五个氨基酸。TID可以包含一个至五个氨基酸。CAR-EC开关可以具有小于约1500Da的摩尔质量。CAR-EC开关可以具有小于约2500Da的摩尔质量。CAR-EC开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至连接子。CAR-ID和TID可以经由连接子位点特异性地连接。CAR-EC开关可以进一步包含一个或多个额外的连接子。一个或多个额外的连接子可以使CAR-ID连接至额外的TID。替代地或另

外,一个或多个连接子可以使TID连接至额外的CAR-ID。一个或多个额外的连接子可以偶联至TID。或者,一个或多个额外的连接子可以偶联至CAR-ID。一个或多个额外的连接子可以使CAR-ID连接至附接于TID的连接子。CAR-ID可以选自FITC、二硝基苯酚、生物素及其衍生物。CAR-ID可以包含FITC。TID可以结合与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少50%同源的标靶。TID可以选自2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸、小分子胆囊收缩素B受体拮抗剂、10聚体肽促黄体激素释放激素、叶酸盐、其衍生物或其修饰的型式。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸。TID可以包含叶酸盐。TID可以结合与选自叶酸盐受体、促黄体激素释放激素受体以及胆囊收缩素B受体的受体至少50%同源的标靶。CAR-ID可以包含FITC并且TID可以结合至与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少50%同源的表面分子。CAR-ID可以包含FITC并且TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸。CAR-ID可以包含FITC并且TID可以结合与叶酸盐受体至少50%同源的表面分子。嵌合抗原受体结合组分可以包含FITC并且TID可以包含叶酸盐或其衍生物。标靶可以是癌细胞。多个CAR-EC开关的均质度可以为至少约90%。

[0007] 本文进一步公开了CAR-EC开关,其包含:(a)包含FITC或其衍生物的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);(b)包含抗体或抗体片段的标靶相互作用域(TID);以及(c)使CAR-ID连接至TID的连接子。抗体或抗体片段可以选自抗Her2抗体、抗CD19抗体或其片段。具有连接子的CAR-EC开关的几何结构可以不同于不具有连接子的CAR-EC开关的几何结构。举例来说,与不具有连接子的开关中CAR-ID对TID的角度相比,CAR-ID对TID的角度可以被连接子改变。具有连接子的开关中CAR-ID与TID之间的距离可以不同于不具有连接子的开关中CAR-ID与TID之间的距离。举例来说,具有连接子的开关中CAR-ID与TID之间的距离可以大于不具有连接子的开关中CAR-ID与TID之间的距离。

[0008] 本文公开了一种用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关,这种开关包含:(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID),其中TID与标靶细胞上的表面分子相互作用。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以经由非天然氨基酸附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID的非天然氨基酸。开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以使CAR-ID经由非天然氨基酸附接至TID。连接子可以使CAR-ID位点特异性地附接至TID的非天然氨基酸。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以在一个或多个末端处包含氨氧基、叠氮基、环辛炔基或其组合。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含三唑。CAR-ID可以包含小分子。小分子可以是半抗原。小分子可以是异硫氰酸荧光素(FITC)。TID可以偶联至FITC的异硫氰酸酯。开关可以进一步包含可以偶联至FITC的异硫氰酸酯的连接子。小分子可以是生物素。TID可以基于或来源于抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于单链可变片段(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于选自自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于选自自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸编码。TID可以由与SEQ ID NO:5-9中的

任一者至少约70%一致的核苷酸序列编码。TID可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:10-17中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:18-56中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。非天然氨基酸可以插入TID可以基于或来源于的抗体的部分中。非天然氨基酸可以置换TID可以基于或来源于的抗体的氨基酸。非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。非天然氨基酸可以是对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)。非天然氨基酸可以插入抗体的轻链中。非天然氨基酸可以插入抗体的重链中。

[0009] 本文进一步公开了表达一个或多个嵌合抗原受体(CAR)的嵌合抗原受体效应细胞。一个或多个CAR可以包含抗FITC抗体或其片段。抗FITC抗体或其片段可以选自鼠类4-4-20scFv、嵌合4D5Flu scFv、鼠类4M5.3scFv以及人类FITC-E2scFv。CAR可以由一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸编码。CAR可以由与一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸至少约70%一致的聚核苷酸编码。

[0010] 本文公开了一种包含用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的多个开关的组合物,其中这多个开关的开关包含(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)与靶细胞上的表面分子相互作用的靶相互作用域(TID),其中至少约60%的开关是结构上同源的。至少约80%的开关可以是结构上同源的。CAR-ID可以包含小分子。小分子可以是异硫氰酸荧光素(FITC)。小分子可以是生物素。小分子可以是二硝基苯酚。TID可以包含小分子。小分子可以是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。小分子可以是叶酸盐或其衍生物。TID可以基于或来源于抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于单链可变片段(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于选自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于选自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸编码。TID可以由与SEQ ID NO:5-9中的任一者至少约70%一致的核苷酸序列编码。TID可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:10-17中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:18-56中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含非天然氨基酸。非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。非天然氨基酸可以是对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)。多个开关的开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以使CAR-ID经由非天然氨基酸附接至TID。连接子可以使CAR-ID位点特异性地附接至TID的非天然氨基酸。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基、环辛炔基或其组合。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含三唑。

[0011] 本文公开了一种包含用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的多个开关的组合物,其中这多个开关的开关包含(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含多肽的靶相互作用域(TID),其中CAR-ID附接至至少60%的开关中的TID中的相同预定位点。CAR-ID可以附接至少约80%的开关中的TID中的

相同预定位点。CAR-ID可以包含小分子。小分子可以是异硫氰酸荧光素(FITC)。小分子可以是生物素。小分子可以是二硝基苯酚。TID可以包含小分子。小分子可以是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。小分子可以是叶酸盐或其衍生物。TID可以包含小分子。TID可以基于或来源于抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于单链可变片段(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于选自抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于选自抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸编码。TID可以由与SEQ ID NO:5-9中的任一者至少约70%一致的核苷酸序列编码。TID可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:10-17中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:18-56中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含非天然氨基酸。非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。非天然氨基酸可以是对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)。多个开关的开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以使CAR-ID经由非天然氨基酸附接至TID。连接子可以使CAR-ID位点特异性地附接至TID的非天然氨基酸。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基、环辛炔基或其组合。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含三唑。TID中的预定位点可以是氨基酸残基。氨基酸残基可以是非天然氨基酸。非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。非天然氨基酸可以是对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)。

[0012] 本文进一步公开了产生CAR-EC开关的方法,其包括使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)位点特异性地连接至靶标相互作用域(TID),从而产生CAR-EC开关。替代地或另外,产生CAR-EC开关的方法可以包括(a)通过将非天然氨基酸并入多肽中来产生靶标相互作用域(TID);以及(b)使TID与嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)接触,从而产生CAR-EC开关。这种方法可以进一步包括使第一连接子偶合至TID以产生包含TID和第一连接子的第一开关中间物。第一连接子可以通过肟接合偶合至TID。这种方法可以进一步包括使第二连接子偶合至CAR-ID以产生包含CAR-ID和第二连接子的第二开关中间物。第二连接子可以通过肟接合偶合至CAR-ID。使TID与CAR-ID接触可以包括使第一开关中间物与第二开关中间物接触。使第一开关中间物与第二开关中间物接触可以包括进行点击化学反应。使第一开关中间物与第二开关中间物接触可以包括进行环加成反应。环加成反应可以是[3+2]环加成反应。

[0013] 本文公开了一种产生包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)靶标相互作用域(TID)的开关的方法,这种方法包括:(a)使第一连接子偶合至TID以产生包含偶联至TID的第一连接子的第一开关中间物;(b)使第一开关中间物偶合至CAR-ID,从而产生开关。这种方法可以进一步包括使第二连接子偶合至CAR-ID以产生包含偶联至CAR-ID的第二连接子的第二开关中间物。使第一开关中间物偶合至CAR-ID可以包括使第一开关中间物偶合至第二开关中间物。使第一连接子偶合至TID可以包括肟接合。第二连接子可以包含环辛

炔。使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括环加成反应。第一连接子可以包含叠氮。环加成反应可以包括使第二连接子的环辛炔与第一连接子的叠氮反应。环加成反应可以包括[3+2]环加成反应。TID可以包含小分子。小分子可以是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。小分子可以是叶酸盐或其衍生物。TID可以基于或来源于抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于单链可变片段(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于选自抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于选自抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸编码。TID可以由与SEQ ID NO:5-9中的任一者至少约70%一致的核苷酸序列编码。TID可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:10-17中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:18-56中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含非天然氨基酸。非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。非天然氨基酸可以是对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。小分子可以是生物素。小分子可以是二硝基苯酚。第一连接子可以是双功能连接子。第一连接子可以是异双功能连接子。第一连接子可以是同双功能连接子。第一连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基、环辛炔基或其组合。第一连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。第一连接子可以包含环辛炔。第一连接子可以是PEG-环辛炔连接子。第一连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。第二连接子可以是双功能连接子。第二连接子可以是异双功能连接子。第二连接子可以是同双功能连接子。第二连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基、环辛炔基或其组合。第二连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。第二连接子可以包含环辛炔。第二连接子可以是PEG-环辛炔连接子。第二连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。

[0014] 本文公开了包含所公开的嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)开关中的任一者的试剂盒。试剂盒可以进一步包含CAR-EC。CAR-EC可以包含与CAR-EC开关的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)相互作用的嵌合抗原受体(CAR)。CAR-EC可以包含表达CAR的T细胞。试剂盒可以进一步包含本文所公开的一个或多个额外的CAR-EC开关。CAR-EC开关可以是不同的。CAR-EC开关可以包含不同的靶相互作用域(TID)。CAR-EC开关可以包含不同的CAR-ID。CAR-EC开关可以是类似的。CAR-EC开关可以包含相同的TID。CAR-EC开关可以包含相同的CAR-ID。

[0015] 本文公开了包含第一开关中间物的试剂盒。第一开关中间物可以包含嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。第一开关中间物可以进一步包含第一连接子。第一连接子可以偶联至CAR-ID。试剂盒可以进一步包含第二开关中间物。第二开关中间物可以包含第一靶相互作用域(TID)。第二开关中间物可以进一步包含第二连接子。第二连接子可以偶联至第一TID。试剂盒可以进一步包含CAR-EC。CAR-EC可以包含与CAR-EC开关的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)相互作用的嵌合抗原受体(CAR)。CAR-EC可以包含表达CAR的T细胞。试剂盒可以进一步包含一个或多个额外的开关中间物。一个或多个开关中间物可以包含一个或多

个额外的CAR-ID。一个或多个额外的开关中间物的CAR-ID可以不同于第一开关中间物的CAR-ID。一个或多个额外的开关中间物的CAR-ID可以与第一开关中间物的CAR-ID相同。包含CAR-ID的一个或多个额外的开关中间物可以进一步包含连接子。包含CAR-ID的一个或多个额外的开关中间物的连接子可以不同于第一开关中间物的第一连接子。包含CAR-ID的一个或多个额外的开关中间物的连接子可以与第一开关中间物的第一连接子相同。替代地或另外，一个或多个开关中间物可以包含一个或多个额外的TID。一个或多个额外的开关中间物的TID可以不同于第二开关中间物的TID。一个或多个额外的开关中间物的TID可以与第二开关中间物的TID相同。包含TID的一个或多个额外的开关中间物可以进一步包含连接子。包含TID的一个或多个额外的开关中间物的连接子可以不同于第二开关中间物的第二连接子。包含TID的一个或多个额外的开关中间物的连接子可以与第二开关中间物的第二连接子相同。

[0016] 本文进一步公开了式XIII的化合物:

[0017] A-L-B (式XIII)

[0018] 其中：

[0019] A是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物或2-(4-((2-氨基-4-氧代3,4-二氢蝶啶-6-基)甲氨基)苯甲酰胺基)戊二酸(叶酸盐)衍生物；

[0020] L是键或连接子;并且

[0021] B是荧光素衍生物或生物素衍生物。

[0022] 在一些实施方案中,式XIII(A-L-B)的A是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物。2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以具有式XIV:

[0023]

$$\text{R}^1\text{OOC}-\text{CH}(\text{Q})-\text{CH}(\text{X})-\text{COOR}^1 \quad (\text{式 XIV})$$

[0024] 其中：

[0025] Q选自由以下组成的群组:

[0026]

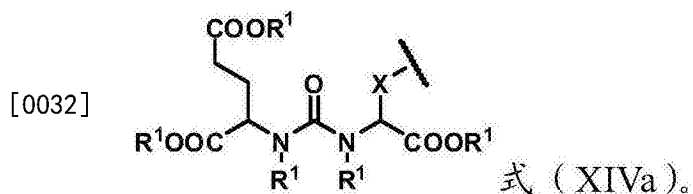
[0027] E选自由以下组成的群组:

[0028]  ;

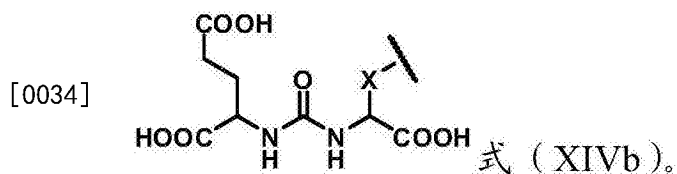
[0029] X是C₁-C₅亚烷基或C₁-C₄亚烷基(C=O)-;并且

[0030] 每个R¹独立地选自氢、C₁-C₄烷基或C₁-C₄卤烷基。

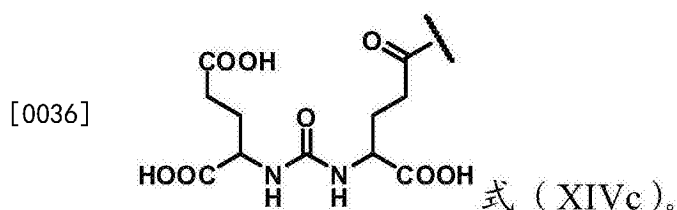
[0031] 2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以具有式XIVa:



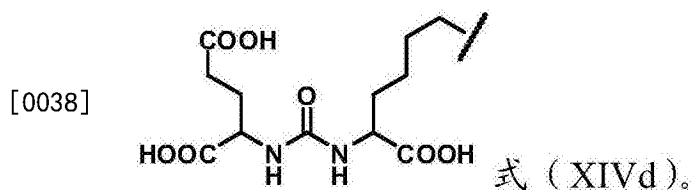
[0033] 2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以是式IIb的2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物:



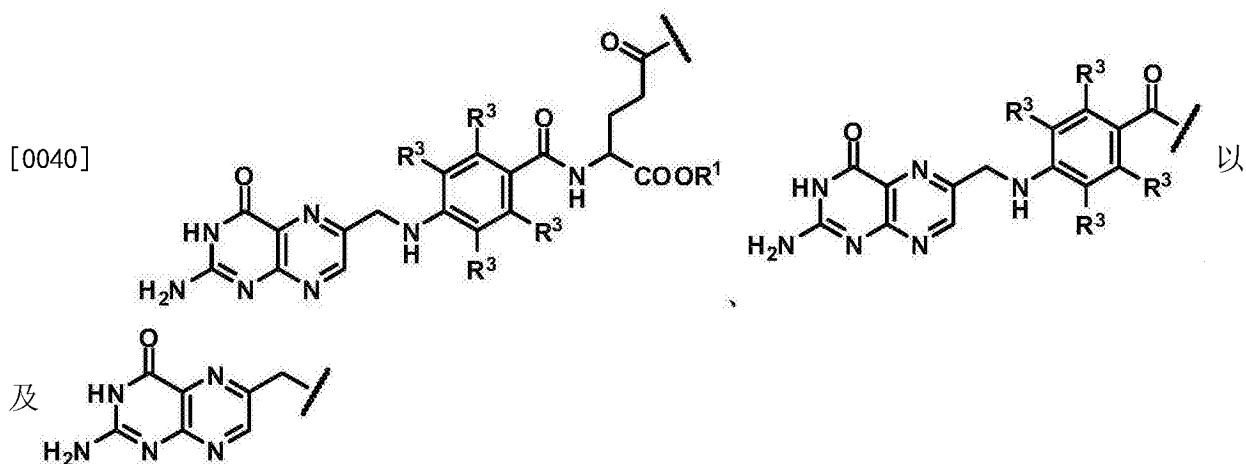
[0035] 2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以具有式XIVc:



[0037] 2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以具有式XIVd:



[0039] 在一些实施方案中,式XIII(A-L-B)的A是叶酸盐衍生物。叶酸盐衍生物可以选自以下组成的群组:

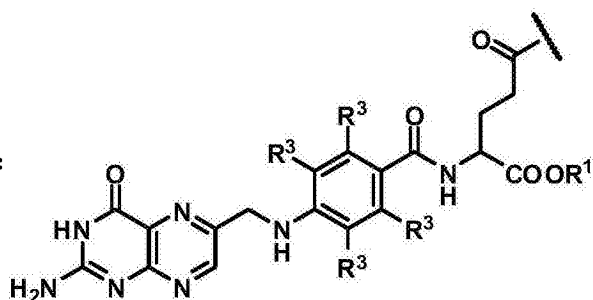


[0041] 其中:

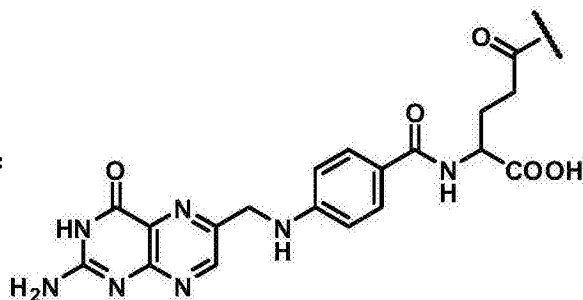
[0042] R¹是氢、C₁-C₄烷基或C₁-C₄卤烷基;并且

[0043] 每个R³独立地选自氢、卤素、C₁-C₄烷基以及C₁-C₄烷氧基。

[0044] 叶酸盐衍生物可以是：

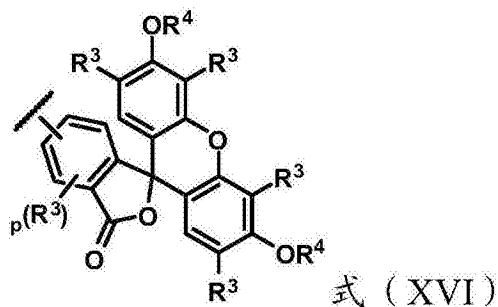
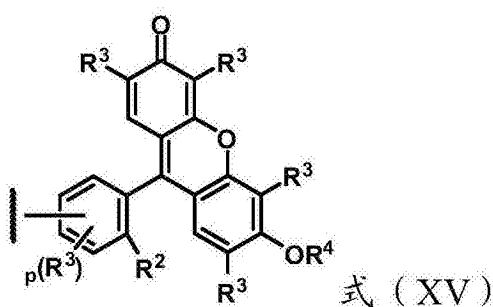


[0045] 叶酸盐衍生物可以是：



[0046] 在一些实施方案中，式XIII(A-L-B)的B是荧光素衍生物。荧光素衍生物可以选自式XV和式XVI：

[0047]



[0048] 其中：

[0049] R^2 是 $-C(=O)O(R^1)$ 或 $-C(=O)N(R^a)_2$ ；

[0050] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1 - C_4 烷基；或

[0051] 两个 R^a 一起形成任选地经取代的杂环基环；

[0052] 每个 R^3 独立地选自氢、卤素、 C_1 - C_4 烷基以及 C_1 - C_4 烷氧基；

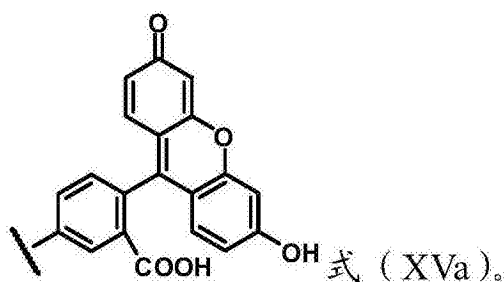
[0053] p 是0-3；

[0054] R^4 是氢、 C_1 - C_4 烷基、 $-C(=O)C_1$ - C_4 烷基或 $-CH_2-C(=O)OR^1$ ；并且

[0055] R^1 是氢、 C_1 - C_4 烷基或 C_1 - C_4 卤烷基。

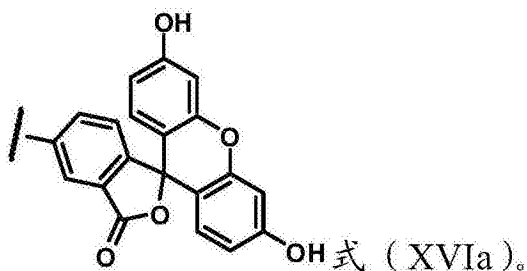
[0056] 式XV的荧光素衍生物可以具有式XVa：

[0057]



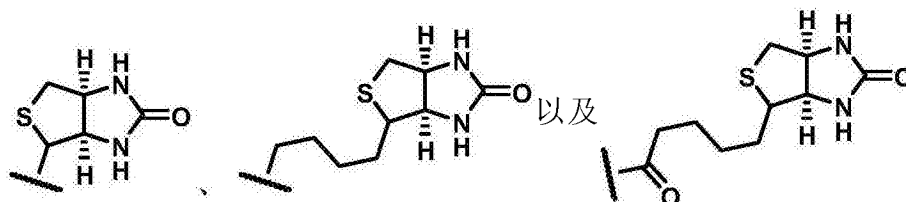
[0058] 式XVI的荧光素衍生物可以具有式XVIa：

[0059]



[0060] 式XIII(A-L-B)的B可以是生物素衍生物。生物素衍生物可以选自由以下组成的群组：

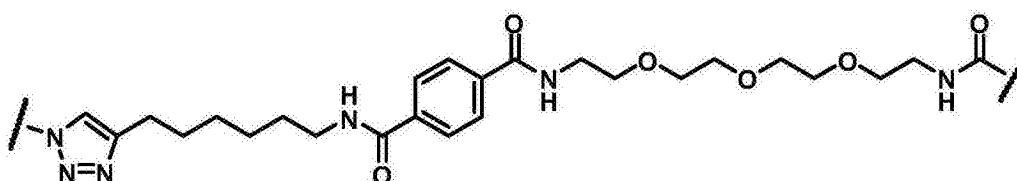
[0061]

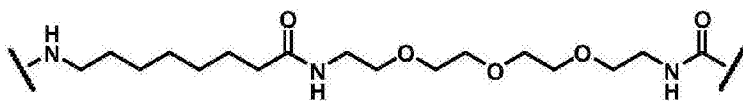
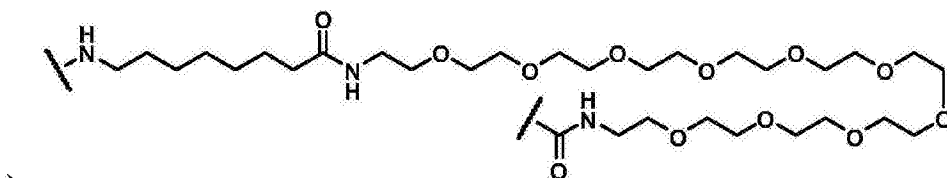


[0062] 式XIII(A-L-B)的L可以是连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。连接子可以包含芳基或杂芳基。连接子可以包含芳基。芳基可以是苯基。苯基可以被二取代。二取代的苯基可以是1,4-二取代的苯基。二取代的苯基可以是1,3-二取代的苯基。苯基可以被三取代。苯基可以被四取代。经取代的苯基的取代基中的两者可以是NO₂。在一些情况下,连接子不包含苯甲基取代基。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含2个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含3个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含4个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含5个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含6个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含7个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含8个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含9个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含10个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含11个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含12个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含13个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含14个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以在一端上包含酰胺。连接子可以在一端上包含酰胺并且在另一端上包含胺。连接子可以在一端上包含酰胺并且在另一端上包含三唑。

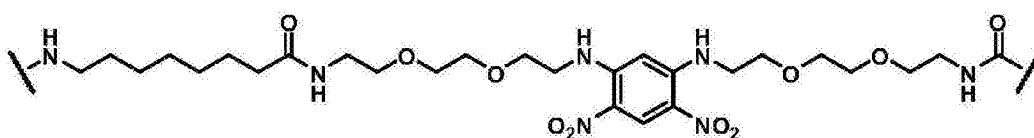
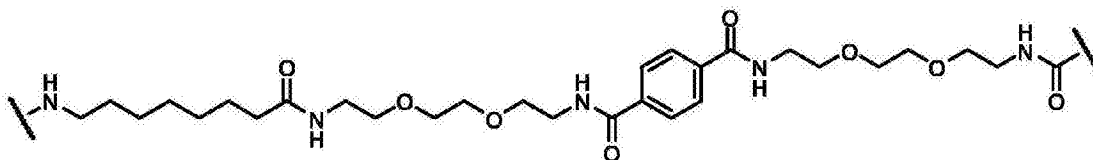
[0063] 连接子可以选自由以下组成的群组：

[0064]

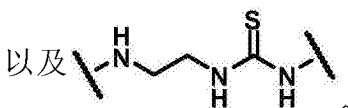




[0065]

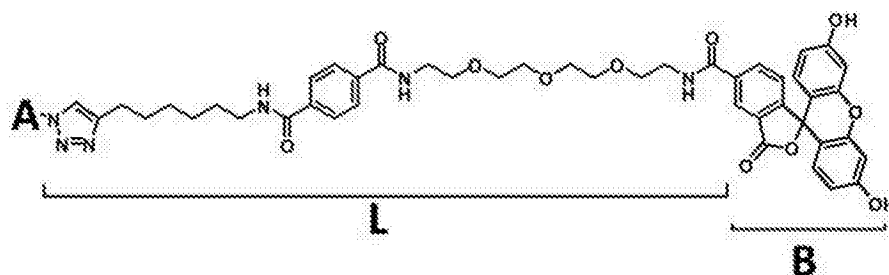


[0066]



[0067] 式XIII(A-L-B)可以具有式XIIIa:

[0068]

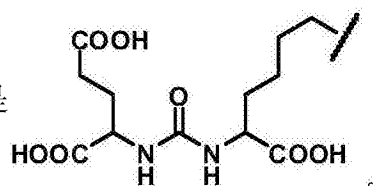


式

(XIIIa)。

[0069]

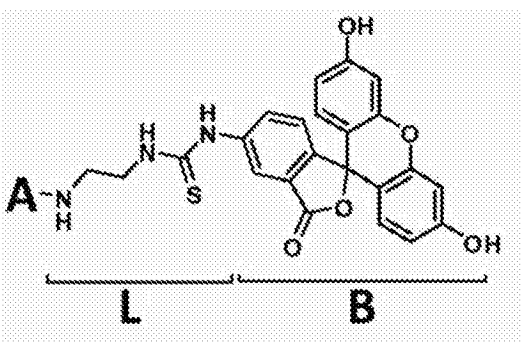
式XIIIa的A可以是



[0070]

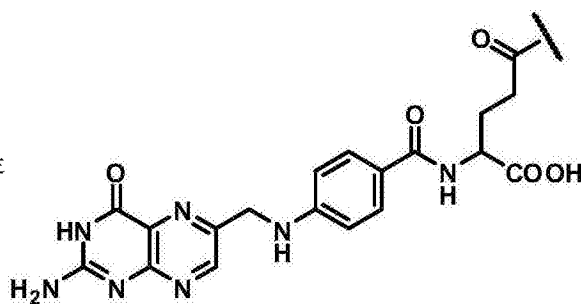
式XIII可以具有式XIIIb:

[0071]



式 (XIIIb)。

[0072] A可以是



[0073] 本文公开了一种用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关中间物,这种开关中间物包含:(a)包含小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID),其中CAR-ID与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用;以及(b)连接至CAR-ID的连接子,其中连接子不包含与CAR-EC相互作用的区域并且连接子不包含与靶细胞上的表面分子相互作用的区域。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基、环辛炔基或其组合。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。

[0074] 本文公开了一种用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关中间物,这种开关中间物包含:(a)包含非天然氨基酸的靶相互作用域(TID),其中TID与靶细胞上的表面分子相互作用;以及(b)连接至TID的连接子,其中连接子不包含直接与CAR-EC相互作用的区域并且连接子不包含直接与靶细胞相互作用的区域。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含同双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以经由脰接合附接至TID。TID可以包含小分子。小分子可以是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。小分子可以是叶酸盐或其衍生物。TID可以基于或来源于抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于单链可变片段(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于选自抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于选自抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸编码。TID可以由与SEQ ID NO:5-9中的任一者至少约70%一致的核苷酸序列编码。TID可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:10-17中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:18-56中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含非天然氨基酸。非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。非天然氨基酸可以是对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)。

[0075] 本文进一步公开了治疗病状的方法,其包括将本文所公开的一个或多个嵌合抗原

受体效应细胞(CAR-EC)开关或其医药组合物施用于有需要的受试者。这种方法可以进一步包括将包含嵌合抗原受体(CAR)的嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)施用于有需要的受试者。CAR-EC开关和CAR-EC可以同时施用。CAR-EC开关和CAR-EC可以依序施用。CAR可以与CAR-EC开关的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)相互作用。CAR-ID可以包含荧光素衍生物或生物素衍生物。CAR-EC开关可以包含标靶相互作用域(TID)。TID可以包含小分子。小分子可以是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。小分子可以是叶酸盐或其衍生物。TID可以基于或来源于抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于单链可变片段(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于抗CD19抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以基于或来源于选自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的至少一部分。TID可以基于或来源于选自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组的抗体的单链可变域(scFv)的至少一部分。TID可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸编码。TID可以由与SEQ ID NO:5-9中的任一者至少约70%一致的核苷酸序列编码。TID可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:10-17中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含与SEQ ID NO:18-56中的任一者至少约70%一致的氨基酸序列。TID可以包含非天然氨基酸。非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。非天然氨基酸可以是对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)。开关可以进一步包含连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含同双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。CAR可以包含抗FITC抗体或其片段。病状可以是癌症。

[0076] 本文公开了治疗疾病或病状的方法,其包括将包含嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)和标靶相互作用域(TID)的第一嵌合抗原效应细胞(CAR-EC)开关施用于有需要的受试者。这种方法可以进一步包括将包含结合至CAR-EC开关的CAR-ID的嵌合抗原受体(CAR)的嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)施用于受试者。CAR-EC开关和CAR-EC可以同时施用。CAR-EC开关和CAR-EC可以依序施用。这种方法可以进一步包括施用第二CAR-EC开关。第一CAR-EC开关可以结合第一标靶上的第一表面分子并且第二CAR-EC开关可以结合第二标靶上的第二表面分子。第一开关和第二开关可以同时施用。第一开关和第二开关可以依序施用。第一表面分子和第二表面分子可以是不同的。第一表面分子和第二表面分子可以是相同的。第一标靶和第二标靶可以是不同的。第一标靶和第二标靶可以是相同的。第一表面分子和第二表面分子可以在不同标靶上。第一表面分子和第二表面分子可以在相同标靶上。第一CAR-EC开关和第二CAR-EC开关可以结合CAR-EC上的相同嵌合抗原受体(CAR)。这种方法可以进一步包括施用一个或多个额外的CAR-EC。CAR-EC可以是相同的。CAR-EC可以是不同的。CAR-EC可以选自T细胞、效应B细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞以及其祖细胞。CAR-EC可以是T细胞。T细胞可以选自初始T细胞、记忆性干细胞T细胞、中枢记忆性T细胞、效应记忆性T细胞、辅助T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD8/CD4+T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、细胞毒性T细胞、自然杀伤T细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞。CAR-EC的CAR可以包含抗体或其片段。抗

体可以包含抗FITC抗体或其片段。其片段可以是scFv。CAR-EC的CAR可以由一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸编码。CAR可以由与一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸至少约70%一致的聚核苷酸编码。病状可以是癌症。癌症可以选自复发性癌症、难治性癌症、成胶质细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、激素难治性前列腺癌以及乳癌。癌症可以包括选自液体肿瘤或实体肿瘤的肿瘤。癌症可以包括异质性肿瘤。癌症可以是血液恶性病。血液恶性病可以选自急性成淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、弥漫性大细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤以及多发性骨髓瘤。血液恶性病可以是B细胞恶性病。血液恶性病可以是CD19阳性血液恶性病。病状可以是感染。

附图说明

[0077] 图1示出了基于FITC的可开关CAR-EC平台的一个非限制性实例。

[0078] 图2A示出了包含具有可以被非天然氨基酸对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)置换的天然氨基酸位点的非限制性实例的抗CD19Fab的标靶相互作用域(TID)的示意图。HC表示重链并且LC表示轻链。

[0079] 图2B示出了由胍反应继之以“点击”反应组成的两步偶联反应,其中对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)残基的酮用作化学把柄以用异双功能N3-TEG-ONH₂连接子修饰蛋白质。在这个示意图中,FITC用环辛炔封端的连接子修饰,可以将其点击至修饰的蛋白质。

[0080] 图3示出了来自在10:1的E:T比率和24小时孵育下FITC-CAR-EC细胞毒性检验的结果。图3A示出了4个FITC-CAR-EC构建体对具有在LC S202处偶联的抗CD19FITC开关的IM-9细胞的细胞毒性。图3B示出了4个FITC-CAR-EC构建体对具有在LC S202处偶联的抗CD19FITC开关的K562细胞的细胞毒性。图3C示出了FITC-CAR-EC 4M5.3对具有在HC K136、LC S202、两者处偶联或非特异性(例如,随机)偶联的FITC开关的IM-9细胞的细胞毒性。图3D示出了FITC-CAR-EC 4M5.3对具有在LC S202处或非特异性(例如,随机)偶联的Her2开关的SKBR3细胞的细胞毒性。LC表示轻链。

[0081] 图4A示出了经由对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)偶联的示意图。pAzF非天然氨基酸并入抗CD19中以产生蛋白原性底物用于单步“点击”偶联至用环辛炔连接子修饰的FITC分子。

[0082] 图4B示出了在三个小鼠模型中测试CAR-EC的功效的流程图。

[0083] 图5A描绘了由TriA连接子连接的2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸和FITC的结构。

[0084] 图5B描绘了2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸-TriA-FITC CAR-EC开关的合成方案。

[0085] 图5C示出了在P-TriA-FITC的连续稀释下靶向C4-2(PSMA+)前列腺癌细胞的抗FITC-CAR T细胞的24小时细胞毒性检验的结果。每种浓度一式三份进行。结果以细胞毒性的平均百分比示出。

[0086] 图6A描绘了叶酸盐-FITC开关的结构。

[0087] 图6B-C示出了在不同浓度的叶酸盐-FITC开关存在下与KB(FR+)(图6B)或A549(FR-)(图6C)标靶细胞共同孵育的抗FITC-CAR-EC的体外细胞毒性检验的结果。每种浓度一式三份进行。结果以细胞毒性的平均百分比示出。

[0088] 图7描绘了CCK2R拮抗剂Z360。

- [0089] 图8描绘了[D-Lys6]-LHRH,天然LHRH(促黄体激素释放激素)的蛋白水解稳定型式。
- [0090] 图9A描绘了抗CD19抗体中突变的位点用于并入对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)以产生包含非天然氨基酸的靶相互作用域(TID)。
- [0091] 图9B描绘了FITC-连接子中间物经由点击反应至包含突变Fab的各种靶相互作用域的一步位点特异性偶联。
- [0092] 图10A-N示出了FITC-抗CD19抗体开关的ESI-MS扫描。
- [0093] 图11示出了FITC-抗CD19抗体开关的SDS-PAGE尺寸排阻色谱法。
- [0094] 图12示出了如通过流式细胞术测量的FITC-抗CD19抗体开关的细胞毒性。
- [0095] 图13示出了在用基于P-TriA-FITC的开关和抗FITC-CART细胞处理的小鼠中的PSMA阳性肿瘤消退。
- [0096] 图14A-I示出了例示性开关的示意图。
- [0097] 图15A-H示出了例示性开关中间物的示意图。
- [0098] 图16示出了产生开关的例示性示意图。
- [0099] 图17A-C示出了CAR-EC调控剂和CAR-EC的示意图。
- [0100] 图18描绘了例示性连接子。
- [0101] 图19描绘了异双功能连接子。
- [0102] 图20示出了合成双功能连接子的一般方案。
- [0103] 图21示出了通过尺寸排阻色谱法纯化并且通过SDS-PAGE表征的FITC-抗CD19抗体偶联物。
- [0104] 图22示出了FITC-抗CD19抗体偶联物的ESI-MS。

具体实施方式

- [0105] 当前CAR-T疗法受困于繁琐的方法和不可接受的安全风险。这些主要限制通常是不足以控制CAR-T活性的方法的结果。举例来说,当前抗CD19CAR-T疗法导致持久的B细胞发育不全。控制CAR-T的活性的开关的引入将允许在消除赘生性细胞之后对切断有响应并且允许B细胞再增殖。新近临床前研究已经展示CAR-T系统可以经由基于抗体的开关控制,其中这种抗体结合靶细胞(例如,癌细胞),这能够使活性切断。虽然这些系统在概念上允许使用CAR-T可开关地靶向肿瘤,但其受困于一系列限制,诸如抗体的非特异性标记。使用半胱氨酸或赖氨酸对抗体的非特异性标记常常产生包括可能是非功能性的,具有改变的药动力学,潜在免疫原性的,和/或难以优化的变体的异质产物。另外,在单个抗体上包含多个CAR-T结合区的基于抗体的开关产生T细胞的多价底物,其可能引起非特异性活化。
- [0106] 嵌合抗原受体(CAR)的免疫原性也是一个隐患。举例来说,一些外来蛋白质(例如,抗毒素蛋白)在CAR-T细胞表面上的表达可以活化不合需要的免疫反应。此外,可以优化通过CAR的信号转导以对标靶(例如,癌细胞)产生最大的所需作用。
- [0107] 开发具有精确的几何结构、受控的活性以及特异性的均质CAR-T细胞开关对于开发具有根除恶性病所必需的效力和持久性同时维持安全可控的治疗的CAR-T疗法可能是至关重要的。本文所公开的组合物、方法、平台以及试剂盒解决了这些需要。
- [0108] 本文公开了用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关。一般来说,

开关包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)标靶相互作用域(TID)。开关可以进一步包含一个或多个连接子。TID可以基于或来源于多肽。可以修饰多肽以包含一个或多个非天然氨基酸。TID可以包含小分子。在一些情况下,TID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸。CAR-ID可以包含小分子。在一些情况下,CAR-ID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸。

[0109] 本文公开了用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关,这种开关包含(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID),其中TID与标靶细胞上的表面分子相互作用。

[0110] 本文公开了用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关,这种开关包含:(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)与标靶细胞上的表面分子相互作用的标靶相互作用域(TID),其中CAR-ID和TID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸。

[0111] 本文公开了表达嵌合抗原受体的效应细胞(CAR-EC)和表达嵌合抗原受体的效应细胞开关(CAR-EC开关),其适用于治疗多种疾病和病状。CAR-EC开关可以包含(a)包含小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含抗体或抗体片段的标靶相互作用域(TID)。抗体或抗体片段可以包含抗体结合片段(Fab片段)或全长抗体。

[0112] 本文进一步公开了CAR-EC开关,其包含(a)包含第一小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含第二小分子的标靶相互作用域(TID)。

[0113] 本文公开了包含用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的多个开关的组合物,其中这多个开关的开关包含(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)与标靶细胞上的表面分子相互作用的标靶相互作用域(TID),其中至少约60%的开关是结构上同源的。

[0114] 本文公开了包含用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的多个开关的组合物,其中这多个开关的开关包含(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含多肽的标靶相互作用域(TID),其中CAR-ID衔接至少60%的开关中的TID的相同氨基酸残基。

[0115] 产生本文所公开的开关和开关中间物的方法可以有利地通过亲和力、化合价、几何结构、连接子长度和/或连接子化学经由CAR-EC开关组分/区域的位点特异性偶联提供CAR-EC细胞活性的控制、脱靶反应性的滴定、肿瘤溶解综合症(TLS)的消除、细胞因子释放综合症(CRS)的衰减和/或CAR-EC开关的优化。

[0116] 本文公开了产生用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关的方法。这种方法可以包括(a)获得包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID);以及(b)使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)衔接至TID,从而产生开关。

[0117] 本文进一步公开了产生用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关的方法,其包括(a)使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与标靶相互作用域(TID)接触;以及(b)通过使CAR-ID衔接至TID上的预定位点来产生开关。

[0118] 本文进一步公开了产生用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关的方法,其包括(a)使多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与多个标靶相互作用域(TID)接触;以及(b)使多个CAR-ID的一个或多个CAR-ID衔接至多个TID的一个或多个TID,从而产

生多个开关,其中至少约60%的开关是结构上同源的。

[0119] 本文进一步公开了产生用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关的方法,其包括(a)使多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与多个靶相互作用域(TID)接触;以及(b)使多个CAR-ID的CAR-ID附接至多个TID的TID,从而产生多个开关,其中CAR-ID附接至至少60%的开关中的TID的相同氨基酸残基。

[0120] 本文进一步公开了产生式IV:X-L1-L2-Y或式IVA:Y-L2-L1-X的开关的方法,其包括(a)使L1偶合至X以产生式IIA:L1-X的第一中间物,其中:i.X包含与效应细胞上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID),并且ii.L1在偶合至X之前包含第一连接子;(b)使L2偶合至Y以产生式VA:Y-L2的第二中间物,其中:i.Y包含与靶细胞上的表面分子相互作用的靶相互作用域(TID),并且ii.L2在偶合至X之前包含第二连接子;以及(c)使第一中间物连接至第二中间物,从而产生式IV(X-L1-L2-Y)或式IVA(Y-L2-L1-X)的开关。

[0121] 本文公开了开关中间物。开关中间物可以包含(a)包含小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID),其中CAR-ID与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用;以及(b)连接至CAR-ID的连接子,其中连接子不包含与CAR-EC相互作用的区域并且连接子不包含与靶细胞上的表面分子相互作用的区域。

[0122] 本文进一步公开了一种开关中间物,其包含(a)包含小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID),其中CAR-ID与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用;以及(b)连接至CAR-ID的连接子,其中连接子在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基和/或环辛炔基。

[0123] 本文进一步公开了一种开关中间物,其包含(a)包含非天然氨基酸的靶相互作用域(TID),其中TID与靶细胞上的表面分子相互作用;以及(b)连接至TID的连接子,其中连接子不包含直接与CAR-EC相互作用的区域并且连接子不包含直接与靶细胞相互作用的区域。

[0124] 本文进一步公开了一种开关中间物,其包含(a)包含多肽或小分子的靶相互作用域(TID),其中TID与靶细胞上的表面分子相互作用;以及(b)连接至TID的连接子,其中连接子在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基和/或环辛炔基。

[0125] 本文进一步公开了产生用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关中间物的方法,其包括(a)使靶相互作用域(TID)与连接子接触,这个连接子在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基和/或环辛炔基;以及(b)使连接子附接至TID,从而产生开关中间物。

[0126] 本文进一步公开了产生用于调控嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关中间物的方法,其包括(a)使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与连接子接触,这个连接子在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基和/或环辛炔基;以及(b)使连接子附接至CAR-ID,从而产生开关中间物。

[0127] 本文进一步公开了通用嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)平台。CAR-EC平台可以包含一个或多个CAR-EC开关、CAR-EC、CAR-EC中间物以及连接子。CAR-EC可以包含有包含针对开关的超高亲和力抗体或抗体片段(例如,scFv)的嵌合抗原受体(CAR)。

[0128] 本文进一步公开了治疗疾病或病状的方法,其包括将CAR-EC开关施用于有需要的受试者。这种方法可以进一步包括将CAR-EC施用于有需要的受试者。CAR-EC开关可以通过

控制开关的施用而提供可滴定的反应、改善的安全性和/或CAR-EC细胞活性的终止。与控制CAR-T细胞活性的先前方法(其“切断”CAR-T活性)成对比,本文所公开的CAR-EC开关一般起到CAR-EC活化剂或“开通”开关的功能。

[0129] 本文公开了治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法,这种方法包括向受试者施用包含以下的开关:(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID),其中TID与标靶细胞上的表面分子相互作用。

[0130] 本文进一步公开了开关制造用于治疗患有癌症的受试者的医药组合物的用途,这种开关包含:(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID),其中TID与标靶细胞上的表面分子相互作用。

[0131] 提供了用于产生CAR-EC平台、CAR-EC开关以及CAR-EC的方法、试剂盒以及组合物。本文所公开的方法、试剂盒以及组合物可以用于活化效应细胞。举例来说,CAR-EC开关的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)可以与效应细胞上的嵌合抗原受体(CAR)相互作用并且CAR-开关的标靶相互作用域(TID)可以与标靶上的表面分子相互作用,从而活化效应细胞并且将效应细胞的活性引导至标靶。这些方法、试剂盒以及组合物可以在许多疾病中发现治疗用途。CAR-EC平台可以用于产生具有不同长度、化合价、定向、连接子、CAR-ID以及TID的多种CAR-EC开关。CAR-EC开关的可变性可以提供CAR-EC开关在治疗多种疾病和病状中的优化。举例来说,异质性肿瘤和血细胞恶性病(例如,急性成淋巴细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病)可以用已经针对特定标靶优化的CAR-EC和CAR-EC开关更有效地治疗。异质性肿瘤还可以用靶向多于一个肿瘤抗原的多个CAR-EC开关更有效地治疗。不同于先前所见的CAR-EC疗法,本发明提供了许多(如果并非全部)这样的优化。本发明的这些和其它目的、优点以及特征对于本领域的技术人员在阅读如下文更全面描述的组合物、方法以及试剂盒的细节后将变得显而易见。

[0132] 除非另有规定,否则如本文所用的术语“开关”和“CAR-EC开关”可互换使用并且可以指小分子-抗体开关、半抗原-抗体开关和/或小分子开关。半抗原-抗体开关或半抗原-小分子开关的抗体部分可以包含抗体的至少一部分或整个抗体。举例来说,半抗原-抗体开关的抗体部分可以包含重链的至少一部分、轻链的一部分、可变区的一部分、恒定区的一部分、互补决定区(CDR)的一部分,或其组合。小分子抗体开关和/或半抗原抗体开关的抗体部分可以包含Fc(可结晶片段)区的至少一部分。小分子抗体开关和/或半抗原抗体开关的抗体部分可以包含互补决定区(例如,CDR1、CDR2、CDR3)的至少一部分。小分子抗体开关和/或半抗原抗体开关的抗体部分可以包含Fab(抗原结合片段)区的至少一部分。半抗原-抗体开关可以是半抗原-Fab开关。

[0133] 在更详细地描述本发明方法、试剂盒以及组合物之前,应了解,本发明并不限于所描述的特定方法、试剂盒或组合物,因为这些当然可以有变化。还应了解,本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不意图具限制性,这是因为本发明的范围将仅受随附权利要求书限制。提出实施例以向本领域的一般技术人员提供如何制造和使用本发明的全面公开和描述,并且不意图限制本发明者视作其发明的范围,也不意图代表下文的实验是所进行的全部或唯一实验。已经努力确保关于所用数值(例如,量、温度等等)的精确度,

但一些实验误差和偏差应考虑在内。除非另有指示,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是大气压或近大气压。

[0134] 在提供值的范围的情况下,应了解,除非上下文另有明确指示,否则还特别地公开介于那个范围的上限与下限之间的每个居中值,至下限单位的十分之一。介于规定范围内的任何规定值或居中值之间的每个较小范围和在那个规定范围内的任何其它规定或居中值涵盖于本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括于范围内或排除在外,并且任一、无一或两个界限包括于较小范围内的每个范围也涵盖于本发明内,受制于在规定的范围内任何特别排除的界限。在规定的范围包括界限中的一者或两者的情况下,排除那些包括的界限中的任一者或两者的范围也包括于本发明中。

[0135] 除非另有规定,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的一般技术人员通常所理解的相同的含义。尽管类似或等效于本文所描述的那些的任何方法和材料可以用于本发明的实施或测试,但现在描述一些潜在和优选的方法和材料。本文所提及的所有公布以引用的方式并入本文中以结合所引用的公布公开和描述方法和/或材料。应了解,在存在矛盾的程度本公开取代所并入的公布的任何公开内容。

[0136] 如本领域的技术人员在阅读本公开后将显而易见,在不脱离本发明的范围或精神的情况下,本文描述和说明的个别实施方案中的每一者具有离散的组分和特征,其可以容易地与其它若干实施方案中的任一者的特征分离或组合。任何叙述的方法可以按所叙述的事件的顺序或按逻辑上可能的任何其它顺序进行。

[0137] 必须注意,除非上下文另有明确指示,否则如本文和随附权利要求书中所用的单数形式“一个(a/an)”和“这个”包括复数个指示物。因此,举例来说,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞并且提及“这个肽”包括提及本领域的技术人员所知的一个或多个肽和其等效物,例如多肽,等等。

[0138] 仅提供本文所论述的公布在本申请的提交日期之前的公开内容。本文中无一事物被解释为承认本发明无权先于因现有发明所作的这类公布。此外,所提供的公布日期可以不同于可能需要独立确认的实际公布日期。

[0139] 虽然本文已经示出和描述本发明的优选实施方案,但本领域的技术人员将显而易见,这类实施方案仅作为实例而提供。在不脱离本发明的情况下众多变更、变化以及取代现在将为本领域的技术人员所想到。应了解,在实施本发明中可以采用本文所描述的本发明的实施方案的各种替代物。以上权利要求书意图界定本发明的范围并且从而涵盖在这些权利要求书的范围内的方法和结构以及其等效物。

[0140] CAR-EC开关

[0141] 本文公开了开关(例如,嵌合抗原受体效应细胞开关、CAR-EC开关)、产生这类开关的方法、以及其用途。一般来说,开关可以包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)标靶相互作用域(TID)。开关可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。开关可以进一步包含一个或多个额外的TID。开关可以进一步包含一个或多个连接子。图14A-I描绘了示例性开关。如图14A中所示,开关可以包含附接至TID(1405)的CAR-ID(1401)。如图14B中所示,开关可以包含CAR-ID(1401)、连接子(1410)以及TID(1405)。连接子(1410)可以使CAR-ID(1401)附接至TID(1405)。如图14C中所示,开关可以包含CAR-ID(1401)、第一连接子(1415)、第二连接子(1410)以及TID(1405)。第一连接子(1415)和第二连接子(1410)可以连

接至彼此。另外,第一连接子(1415)可以附接至CAR-ID(1401)并且第二连接子(1410)可以附接至TID(1405),从而使得CAR-ID(1401)附接至TID(1405)。第一连接子(1410)和第二连接子(1415)可以是相同的。第一连接子(1410)和第二连接子(1415)可以是不同的。

[0142] 开关可以包含CAR-ID和两个或更多个TID。如图14D中所示,开关可以包含CAR-ID(1401)、第一TID(1405)以及第二TID(1420)。第一TID(1405)和第二TID(1420)可以附接至CAR-ID(1401)。如图14E中所示,开关可以包含CAR-ID(1401)、连接子(1410)、第一TID(1405)以及第二TID(1420)。连接子(1410)可以使第一TID(1405)附接至CAR-ID(1401)。第二TID(1420)可以附接至CAR-ID(1401)。如图14F中所示,开关可以包含CAR-ID(1401)、第一连接子(1410)、第二连接子(1415)、第一TID(1405)以及第二TID(1420)。第一连接子(1410)可以使第一TID(1405)附接至CAR-ID(1401)。第二连接子(1415)可以使第二TID(1420)附接至CAR-ID(1401)。第一TID(1405)和第二TID(1420)可以是相同的。第一TID(1405)和第二TID(1420)可以是不同的。第一连接子(1410)和第二连接子(1415)可以是相同的。第一连接子(1410)和第二连接子(1415)可以是不同的。开关可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。开关可以进一步包含一个或多个额外的TID。开关可以进一步包含一个或多个连接子。

[0143] 开关可以包含TID和两个或更多个CAR-ID。如图14G中所示,开关可以包含TID(1405)、第一CAR-ID(1401)以及第二CAR-ID(1425)。第一CAR-ID(1401)和第二CAR-ID(1425)可以附接至TID(1405)。如图14H中所示,开关可以包含TID(1405)、连接子(1410)、第一CAR-ID(1401)以及第二CAR-ID(1425)。连接子(1410)可以使第一CAR-ID(1401)附接至TID(1405)。第二CAR-ID(1425)可以附接至TID(1405)。如图14I中所示,开关可以包含TID(1405)、第一连接子(1410)、第二连接子(1415)、第一CAR-ID(1401)以及第二CAR-ID(1425)。第一连接子(1410)可以使第一CAR-ID(1401)附接至TID(1405)。第二连接子(1415)可以使第二CAR-ID(1425)附接至TID(1405)。第一CAR-ID(1401)和第二CAR-ID(1425)可以是相同的。第一CAR-ID(1401)和第二CAR-ID(1425)可以是不同的。第一连接子(1410)和第二连接子(1415)可以是相同的。第一连接子(1410)和第二连接子(1415)可以是不同的。开关可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。开关可以进一步包含一个或多个额外的TID。开关可以进一步包含一个或多个连接子。

[0144] CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID附接至TID可以通过本领域中已知的任何方法发生。举例来说,CAR-ID可以通过融合、插入、嫁接或偶联而附接至TID。CAR-ID可以融合至TID。CAR-ID可以插入TID中。CAR-ID可以偶联至TID。

[0145] 开关可以包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)标靶相互作用域(TID)。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸、叶酸盐或其衍生物。包含有包含半抗原的CAR-ID和包含小分子的TID的开关可以称作半抗原-小分子开关。

[0146] 开关可以包含嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)标靶相互作用域(TID)。CAR-ID可以与效应细胞上的嵌合抗原受体(CAR)相互作用。TID可以与标靶上的表面分子相互作用。TID可以包含非天然氨基酸。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。可以修饰抗体或抗体片段以含有一个或多个非天然氨基酸。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID中的非天然氨基酸。包含有包含小分子的CAR-ID和包含抗体或抗体片段的TID的开关可以称作小分子-抗体

开关。

[0147] 开关可以包含(a)包含FITC或其衍生物的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)标靶相互作用域(TID)。TID可以基于或来源于抗体的重链。TID可以基于或来源于抗体的轻链。TID可以基于或来源于抗体的Fab。TID可以包含抗CD19抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗Her2抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗CS1抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗BCMA抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗EGFRvIII抗体或其片段。TID可以基于或来源于选自抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体、抗CD33抗体或其片段或其组合的抗体或抗体片段。TID可以是抗CD19Fab。TID可以是抗CD22Fab。TID可以是抗Her2Fab。TID可以是抗CS1Fab。TID可以是抗BCMA Fab。TID可以是抗EGFRvIII Fab。TID可以基于或来源于选自抗CD20Fab、抗EGFR Fab、抗CEA Fab、抗CLL-1Fab、抗CD33Fab或其组合的Fab。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以融合至TID。CAR-ID可以插入TID中。TID可以插入CAR-ID中。CAR-EC开关可以进一步包含一个或多个连接子。一个或多个连接子可以使CAR-ID附接至TID。CAR-EC开关可以进一步包含一个或多个非天然氨基酸。CAR-ID可以包含一个或多个非天然氨基酸。TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。CAR-ID和TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。CAR-ID可以经由CAR-ID中的一个或多个非天然氨基酸附接至TID。CAR-ID可以经由TID中的一个或多个非天然氨基酸附接至TID。CAR-ID可以经由CAR-ID中的一个或多个非天然氨基酸和TID中的一个或多个非天然氨基酸附接至TID。

[0148] 开关可以包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及标靶相互作用域(TID),其中CAR-ID和TID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸。CAR-ID可以包含第一小分子。TID可以包含第二小分子。第一小分子和第二小分子可以是不同的。开关可以进一步包含一个或多个连接子。开关可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。开关可以进一步包含一个或多个额外的TID。CAR-ID可以包含一个氨基酸。CAR-ID可以包含约1个、约2个、约3个、约4或约5个氨基酸。CAR-ID可以包含两个或更多个氨基酸。两个或更多个氨基酸可以彼此相邻。两个或更多个氨基酸可以连接至彼此。两个或更多个氨基酸可以彼此不相邻。两个或更多个氨基酸可以不由酰胺键连接。

[0149] 开关可以包含(a)与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)与标靶细胞上的表面分子相互作用的标靶相互作用域(TID),其中CAR-ID和TID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸。开关可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自由DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津(atrazine)、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪(hydralazine)、氟烷(halothane)、地高辛(digoxigenin)、苯膦酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。开关可以进一步包含一个或多个额外的TID。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生物。开关可以进一步包含连接子。开关可以进一步包含两个或更多个连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氨基、环辛炔基或其组合。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包

含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。

[0150] 开关可以包含(a)包含FITC的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)结合至与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少50%同源的表面分子的靶相互作用域(TID)。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸或其衍生物或修饰的型式。TID可以结合至与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少50%、55%、57%、60%、62%、65%、67%、70%、72%、75%、77%、80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%或约100%同源的表面分子。TID可以结合至与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少70%同源的表面分子。TID可以结合至与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少80%同源的表面分子。TID可以结合至与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少90%同源的表面分子。TID可以结合至与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少95%同源的表面分子。

[0151] 开关可以包含(a)包含FITC的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)结合至与叶酸受体至少50%同源的靶的靶相互作用域(TID)。TID可以包含小分子。TID可以包含叶酸或其衍生物或修饰的型式。TID可以结合至与叶酸受体约50%、55%、57%、60%、62%、65%、67%、70%、72%、75%、77%、80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%或约100%同源的表面分子。TID可以结合至与叶酸受体约70%同源的表面分子。TID可以结合至与叶酸受体约80%同源的表面分子。TID可以结合至与叶酸受体约90%同源的表面分子。TID可以结合至与叶酸受体约95%同源的表面分子。

[0152] 开关可以小于约1000kDa、1100kDa、1200kDa、1300kDa、1400kDa、1500kDa、1600kDa、1700kDa、1800kDa、1900kDa、2000kDa、2100kDa、2200kDa、2300kDa、2400kDa、2500kDa、2600kDa、2700kDa、2800kDa、2900kDa,或小于约3000kDa。开关可以小于约1200kDa。开关可以小于约1500kDa。CAR-EC开关可以小于约2000kDa。

[0153] 包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以至少等于包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以大于包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约10%。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约25%。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约50%。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约75%。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性

百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约85%。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约90%。

[0154] 包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约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或10倍。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100倍。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约200、300、400、500、600、700、800、900或1000倍。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约2倍。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约3倍。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约4倍。包含按位点特异性方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比可以比包含按随机方式附接至TID的CAR-ID的开关的细胞毒性百分比大至少约5倍。

[0155] 开关中间物

[0156] 本文公开了开关中间物(例如,嵌合抗原受体效应细胞开关中间物、CAR-EC开关中间物)、产生这类开关的方法、以及其用途。一般来说,开关中间物包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)连接子。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的连接子。CAR-ID可以包含一个或多个官能团。连接子可以包含一个或多个官能团。包含CAR-ID的开关中间物可以称作CAR-ID开关中间物。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自由DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯膦酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以在一端处包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。连接子可以通过肟接合附接至CAR-ID。

[0157] 开关中间物可以包含(a)包含小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID),其中CAR-ID与CAR-EC上的嵌合抗原受体相互作用;以及(b)连接至CAR-ID的连接子,其中连接子在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基和/或环辛炔基。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自由DOTA、二硝基苯酚、醌、生

物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯肿酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨氧基。连接子可以是叠氮-PEG-氨氧基连接子。连接子可以在一端处包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以通过脰接合附接至CAR-ID。

[0158] 替代地或另外,开关中间物可以包含(a)标靶相互作用域(TID);以及(b)连接子。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的TID。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的连接子。TID可以包含一个或多个官能团。连接子可以包含一个或多个官能团。包含TID的开关中间物可以称作TID开关中间物。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的TID。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生物。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以在一个或多个末端处包含氨氧基、叠氮基、环辛炔基或其组合。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨氧基。连接子可以是叠氮-PEG-氨氧基连接子。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。连接子可以通过脰接合附接至TID。

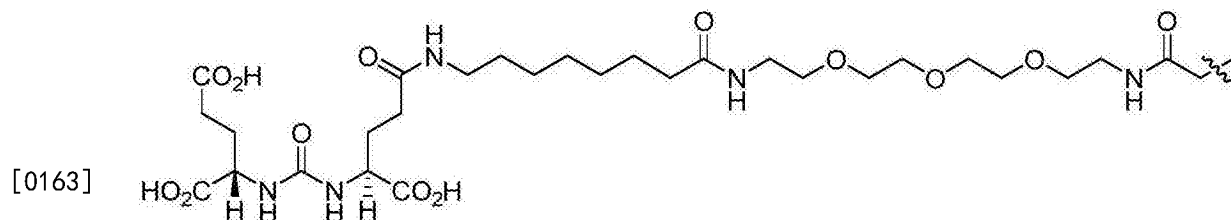
[0159] 开关中间物可以包含(a)包含多肽或小分子的标靶相互作用域(TID),其中TID与标靶细胞上的表面分子相互作用;以及(b)连接至TID的连接子,其中连接子在一个或多个末端处包含烷氧基-胺(或氨氧基)基团、叠氮基和/或环辛炔基。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的TID。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生物。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任

一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。开关中间物可以进一步包含一个或多个额外的连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基、环辛炔基或其组合。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。

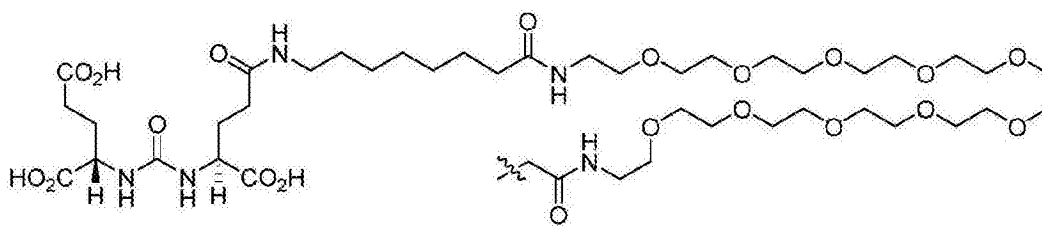
[0160] 图15A-H描绘了例示性开关中间物。图15A示出了包含CAR-ID(1505)和连接子(1510)的开关中间物。图15B示出了包含CAR-ID(1505)和连接子(1520)的开关中间物,其中连接子包含官能团(1515)。图15C示出了包含CAR-ID(1505)、第一连接子(1510)以及第二连接子(1555)的开关中间物。图15D示出了包含CAR-ID(1505)、第一连接子(1520)以及第二连接子(1555)的开关中间物,其中第一连接子(1520)包含官能团(1515)。图15E示出了包含TID(1535)和连接子(1540)的开关中间物。图15F示出了包含TID(1535)和连接子(1550)的开关中间物,其中连接子包含官能团(1545)。图15G示出了包含TID(1535)、第一连接子(1540)以及第二连接子(1560)的开关中间物。图15H示出了包含TID(1535)、第一连接子(1550)以及第二连接子(1560)的开关中间物,其中第一连接子(1550)包含官能团(1545)。

[0161] 开关中间物可以包含式IIIA:L1-Y或式III:Y-L1的化合物,其中Y包含与与PSMA至少50%同源的表面分子相互作用的TID并且L1包含连接子。开关中间物可以包含式IIIA:L1-Y或式III:Y-L1的化合物,其中Y包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸并且L1包含连接子。TID可以与与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少50%、55%、57%、60%、62%、65%、67%、70%、72%、75%、77%、80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%或约100%同源的表面分子相互作用。TID可以与与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少70%同源的表面分子相互作用。TID可以与与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少80%同源的表面分子相互作用。TID可以与与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少90%同源的表面分子相互作用。TID可以与与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少95%同源的表面分子相互作用。

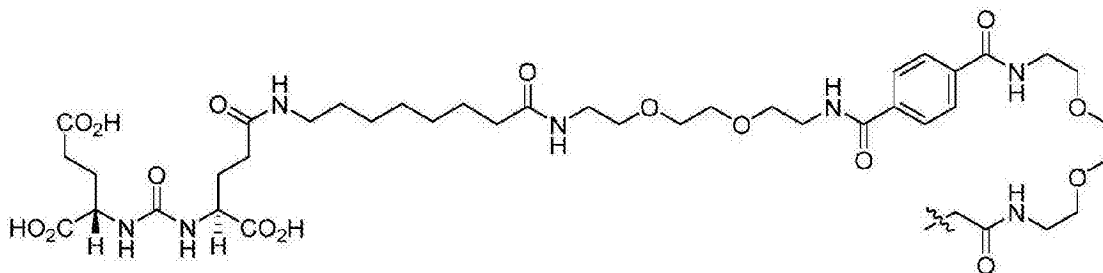
[0162] 经由非限制性实例,开关中间物可以包含选自式VI、式VII、式VIII以及式IX的化合物的化合物:



(式 VI),

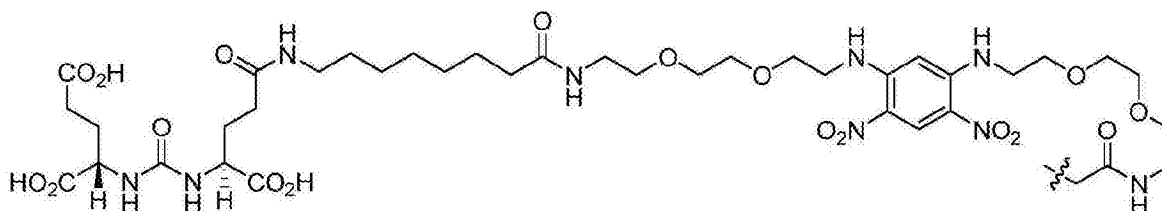


[0164] (式 VII),



(式 VIII),以及

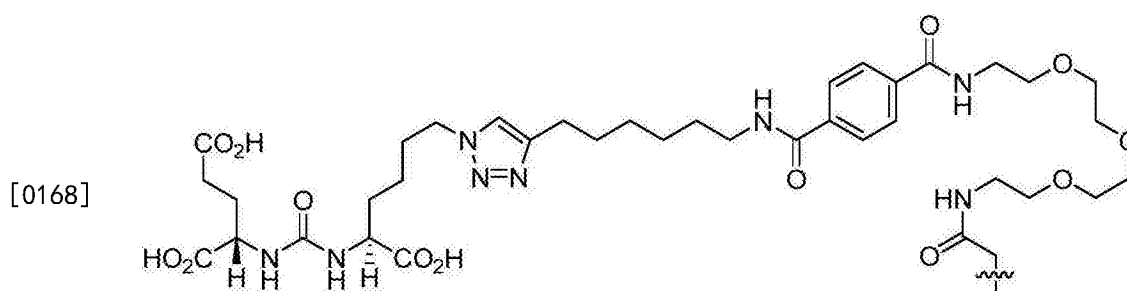
[0165]



(式 IX)。

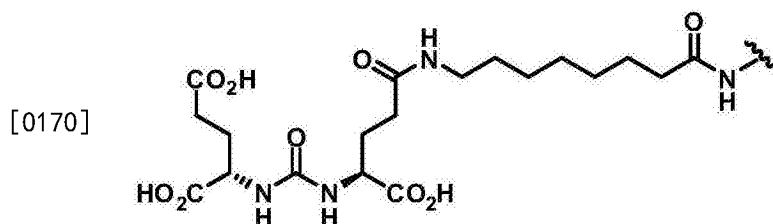
[0166] 经由非限制性实例,开关中间物可以包含选自式VI、式VII、式VIII以及式IX的化合物的衍生物、类似物、异构体、重排或修饰的化合物。

[0167] 开关中间物可以包含式X的化合物:



(式 X)。

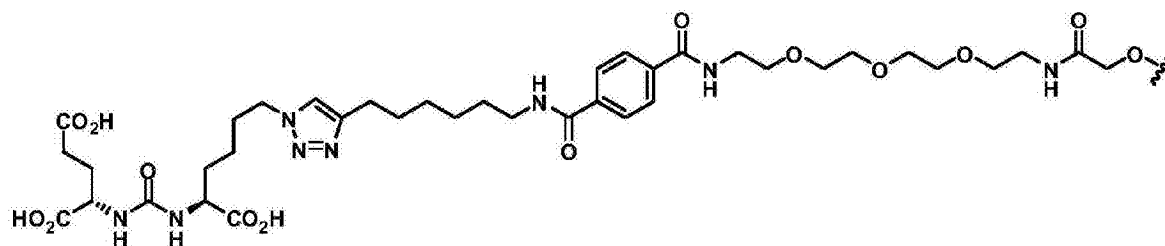
[0169] 开关中间物可以包含式XI的化合物:



(式 XI)。

[0171] 开关中间物可以包含式XII的化合物:

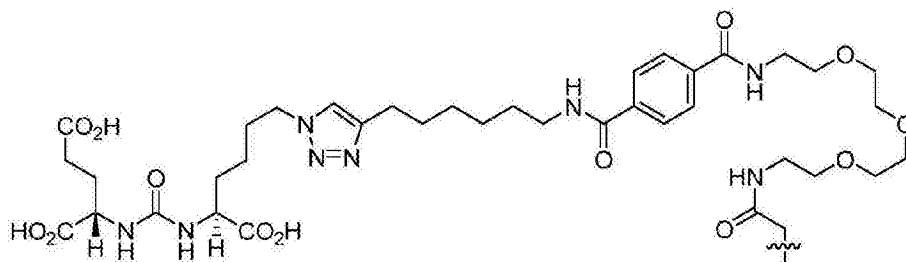
[0172]



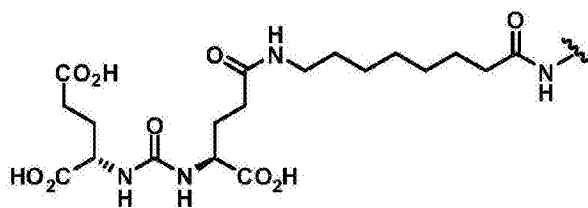
(式 XII)。

[0173] 经由非限制性实例,开关中间物可以包含选自式X、式XI以及式XII的化合物的衍生物、类似物、异构体、重排或修饰的化合物:

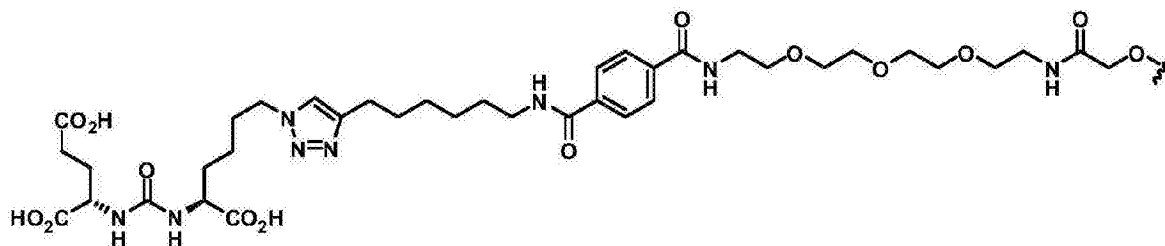
[0174]



(式 X),



(式 XI),



(式 XII)。

[0175] 本文进一步公开了式XIII的CAR-EC开关:

[0176] A-L-B (式XIII)

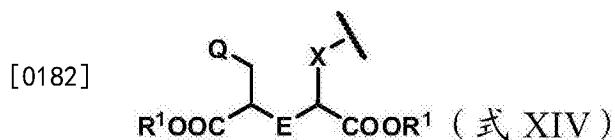
[0177] 其中:

[0178] A是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物或2-(4-((2-氨基-4-氧代3,4-二氢蝶啶-6-基)甲氨基)苯甲酰胺基)戊二酸(叶酸盐)衍生物;

[0179] L是键或连接子;并且

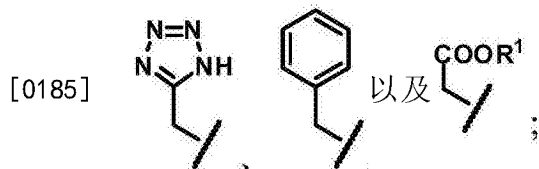
[0180] B是荧光素衍生物或生物素衍生物。

[0181] 在一些实施方案中,式XIII(A-L-B)的A是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物。2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以具有式XIV:

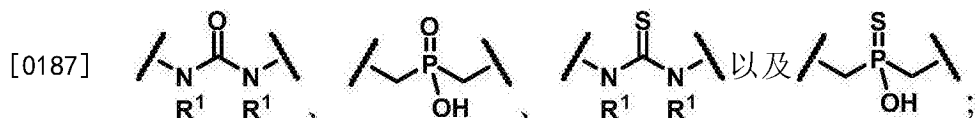


[0183] 其中:

[0184] Q选自由以下组成的群组:



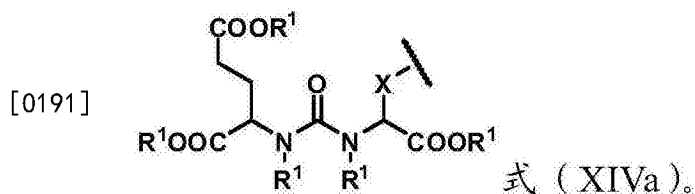
[0186] E选自由以下组成的群组:



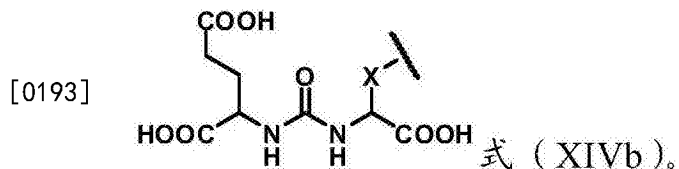
[0188] X是C₁-C₅亚烷基或C₁-C₄亚烷基(C=O)-;并且

[0189] 每个R¹独立地选自氢、C₁-C₄烷基或C₁-C₄卤烷基。

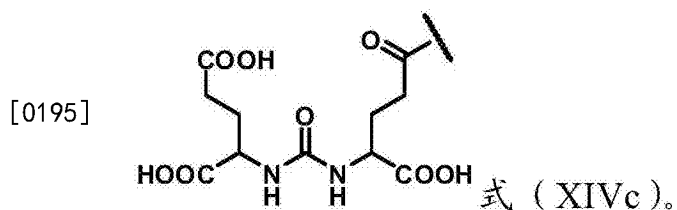
[0190] 2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以具有式XIVa:



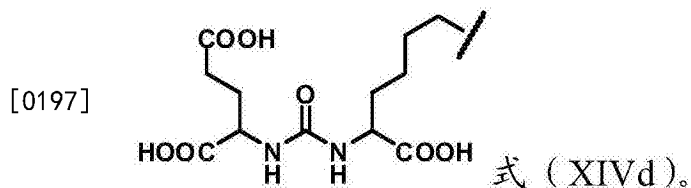
[0192] 2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以是式IIb的2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物:



[0194] 2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以具有式XIVc:

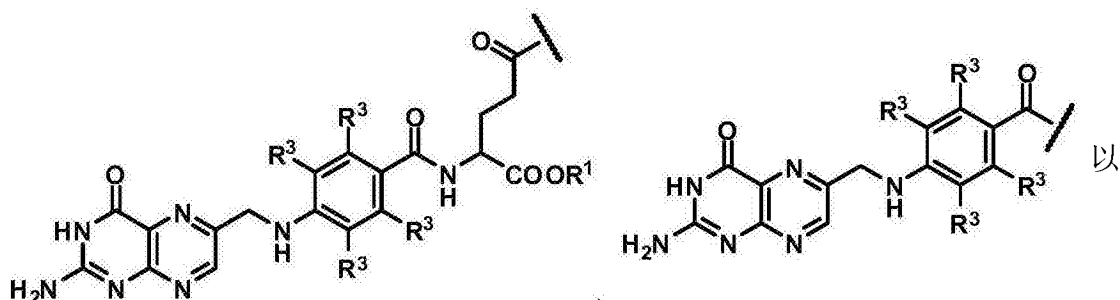


[0196] 2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸衍生物可以具有式XIVd:

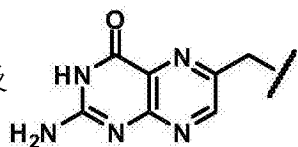


[0198] 在一些实施方案中,式XIII(A-L-B)的A是叶酸盐衍生物。叶酸盐衍生物可以选自由以下组成的群组:

[0199]



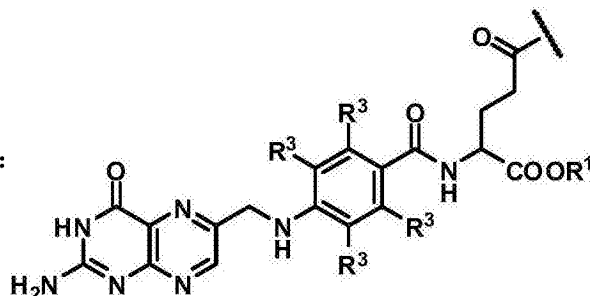
及



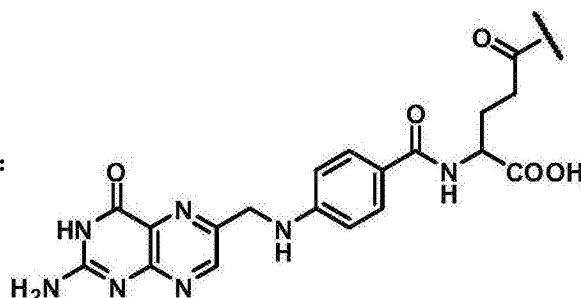
[0200] 其中：

[0201] R^1 是氢、 C_1 - C_4 烷基或 C_1 - C_4 卤烷基；并且[0202] 每个 R^3 独立地选自氢、卤素、 C_1 - C_4 烷基以及 C_1 - C_4 烷氧基。

[0203] 叶酸盐衍生物可以是：

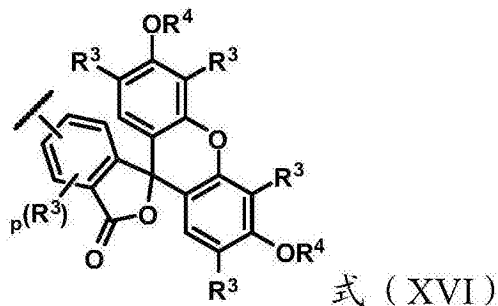
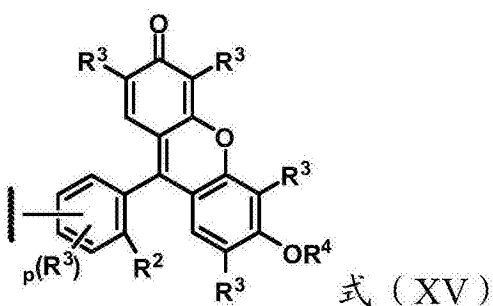


[0204] 叶酸盐衍生物可以是：



[0205] 在一些实施方案中，式XIII(A-L-B)的B是荧光素衍生物。荧光素衍生物可以选自式XV和式XVI：

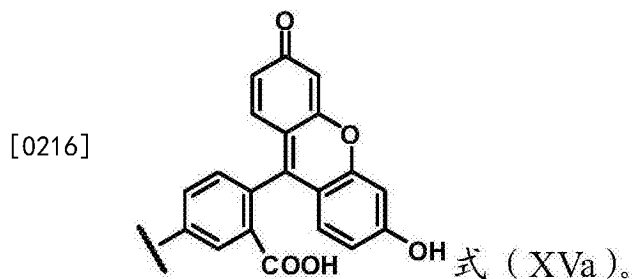
[0206]



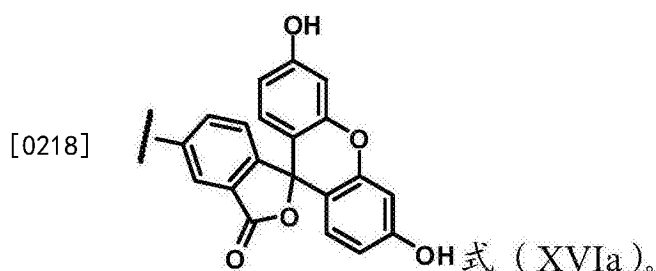
[0207] 其中：

[0208] R^2 是 $-C(=O)O(R^1)$ 或 $-C(=O)N(R^a)_2$ ；[0209] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1 - C_4 烷基；或[0210] 两个 R^a 一起形成任选地经取代的杂环基环；

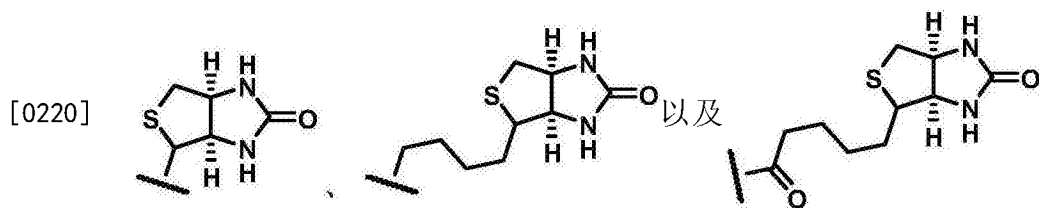
- [0211] 每个 R^3 独立地选自氢、卤素、 C_1 - C_4 烷基以及 C_1 - C_4 烷氧基；
 [0212] p 是0-3；
 [0213] R^4 是氢、 C_1 - C_4 烷基、 $-C(=O)C_1$ - C_4 烷基或 $-CH_2-C(=O)OR^1$ ；并且
 [0214] R^1 是氢、 C_1 - C_4 烷基或 C_1 - C_4 卤烷基。
 [0215] 式XV的荧光素衍生物可以具有式XVa：



- [0217] 式XVI的荧光素衍生物可以具有式XVIa：



- [0219] 式XIII(A-L-B)的B可以是生物素衍生物。生物素衍生物可以选自由以下组成的群组：

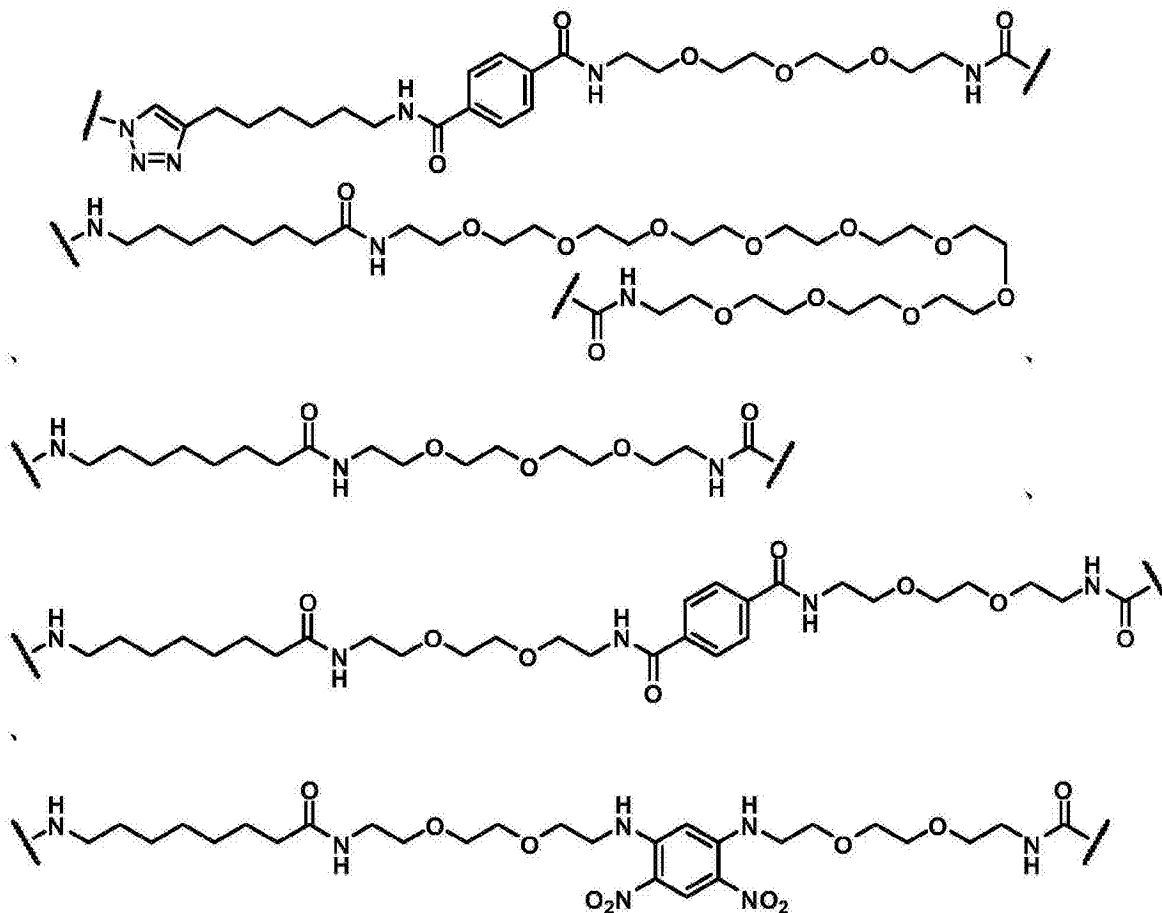


- [0221] 式XIII(A-L-B)的L可以是连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。连接子可以包含芳基或杂芳基。连接子可以包含芳基。芳基可以是苯基。苯基可以被二取代。二取代的苯基可以是1,4-二取代的苯基。二取代的苯基可以是1,3-二取代的苯基。苯基可以被三取代。苯基可以被四取代。经取代的苯基的取代基中的两者可以是 NO_2 。在一些情况下,连接子不包含苯甲基取代基。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含2个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含3个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含4个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含5个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含6个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含7个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含8个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含9个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含10个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含11个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含12个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含13个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含14个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以在一端上包含酰胺。连接子可以在一端上包含酰胺并且在另一端上包含胺。

连接子可以在一端上包含酰胺并且在另一端上包含三唑。

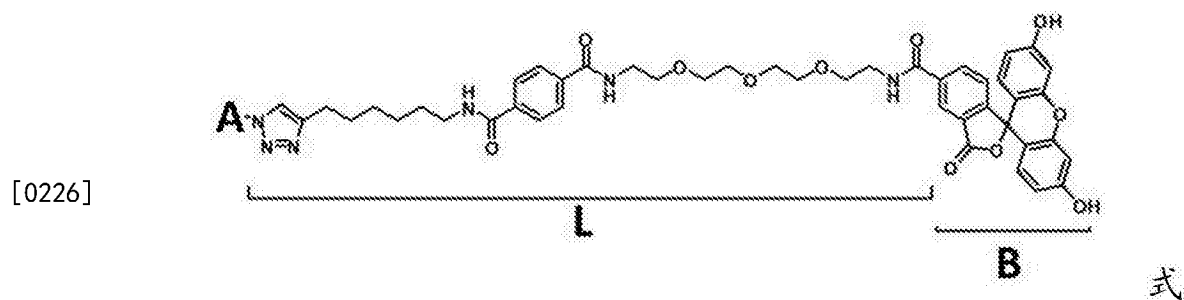
[0222] 连接子可以选自由以下组成的群组：

[0223]



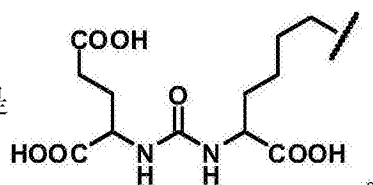
[0224] 以及 。

[0225] 式XIII(A-L-B)可以具有式XIIIa：



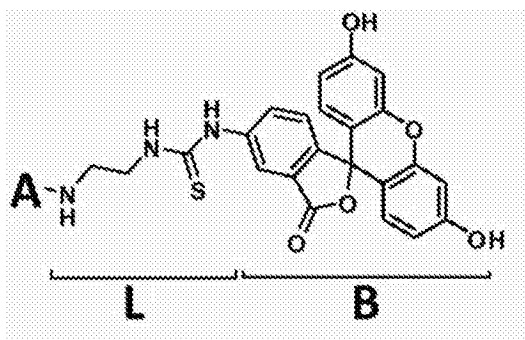
(XIIIa)。

[0227] 式XIIIa的A可以是



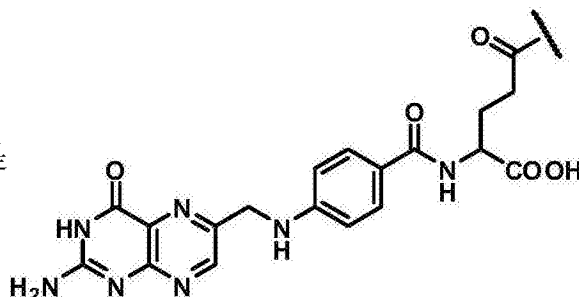
[0228] 式XIII可以具有式XIIIb：

[0229]



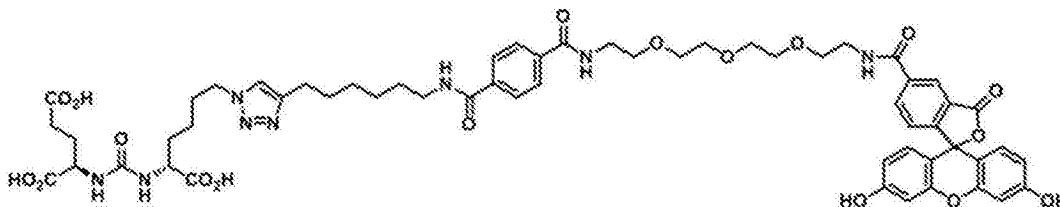
式 (XIIIb)。

[0230] A可以是



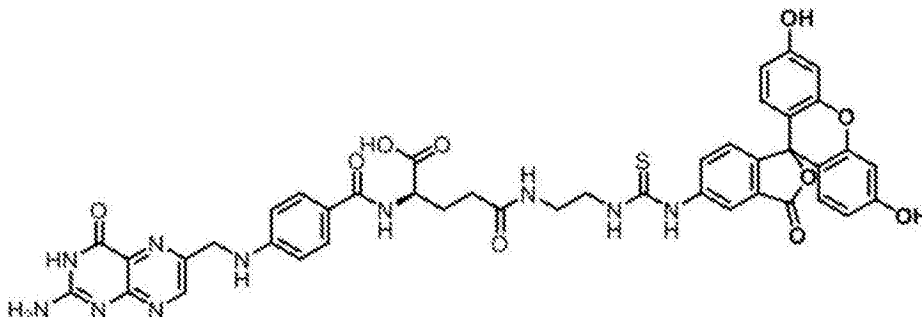
[0231] 在式XIII的CAR-EC开关的一些实施方案中,CAR-EC开关是:

[0232]



在式XIII的CAR-EC开关的其它实施方案中,CAR-EC开关是:

[0233]



[0234] 嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)

[0235] 本文所公开的开关可以包含一个或多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。本文所公开的开关可以包含两个或更多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。本文所公开的开关可以包含三个或更多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。本文所公开的开关可以包含四个或更多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。本文所公开的开关可以包含5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。两个或更多个CAR-ID可以是相同的。三个或更多个CAR-ID中的至少两者可以是相同的。两个或更多个CAR-ID可以是不同的。三个或更多个CAR-ID中的至少两者可以是不同的。CAR-ID的数目可以针对功能性和功效而优化。举例来说,每个TID一个或两个CAR-ID可以得到有效的CAR-T活化,而每个TID三个或四个CAR-ID可以引起CAR-T的非特异性活化。

[0236] 本文所公开的开关中间物可以包含一个或多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。本文所公开的开关中间物可以包含两个或更多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。本文所公开的开关中间物可以包含三个或更多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。本文所公开的开关中间物可以包含四个或更多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。本文所公开的开关中间物可以包含5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。两个或更多个CAR-ID可以是相同的。三个或更多个CAR-ID中的至少两者可以是相同的。两个或更多个CAR-ID可以是不同的。三个或更多个CAR-ID中的至少两者可以是不同的。

[0237] CAR-ID可以是天然存在的分子。举例来说, CAR-ID可以基于或来源于内源性蛋白质。或者, CAR-ID可以包含蛋白质的野生型型式。CAR-ID可以是人工或合成分子。举例来说, CAR-ID可以包含有包含一个或多个非天然氨基酸的蛋白质。或者, CAR-ID可以包含野生型蛋白质的修饰的型式, 其不是天然存在的。CAR-ID可以在不附接至CAR-EC开关的标靶相互作用域(TID)时能够跨越细胞膜。在一些情况下, CAR-ID的至少一部分不是遗传编码的。CAR-ID的至少一部分可以是合成的。CAR-ID可以包含非天然存在的多肽。CAR-ID可以是有机分子。CAR-BC可以是无机分子。

[0238] CAR-ID可以是小分子。小分子可以是有机化合物。小分子可以具有约 10^{-8}m 、约 10^{-9}m 、约 10^{-10}m 的数量级的尺寸。小分子可以具有小于约 10^{-7}m 的尺寸。小分子可以具有小于约 10^{-8}m 的尺寸。小分子可以具有小于约 10^{-9}m 的尺寸。小分子可以具有小于约 10^{-10}m 的尺寸。小分子可以具有小于约 10^{-11}m 的尺寸。

[0239] 小分子可以具有小于约5000kDa、小于约4500kDa、小于约4000kDa、小于约3500kDa、小于约3000kDa、小于约2500kDa、小于约2000kDa、小于约1500kDa、小于约1000kDa、小于约900kD、小于约500kDa或小于约100kDa的质量。

[0240] 在一些情况下, 小分子不包含多肽。在一些情况下, 小分子包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸。小分子可以是化合物。

[0241] CAR-ID可以包含半抗原。CAR-ID当附接至较大载体分子, 诸如蛋白质、抗体或抗体片段时可以诱导免疫反应。CAR-ID可以是FITC或其衍生物。CAR-ID可以选自DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯肿酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物。CAR-ID可以是青霉素药物或其衍生物。CAR-ID可以是醌或其衍生物。CAR-ID可以是DOTA或其衍生物。CAR-ID可以是二硝基苯酚或其衍生物。CAR-ID可以是生物素或其衍生物。

[0242] 或者, CAR-ID不包含半抗原。CAR-ID可以选自类固醇、维生素、类维生素、代谢物、抗生素、单糖、二糖、脂质、脂肪酸、核酸、生物碱、糖苷、吩噻、聚酮、萜烯和四吡咯以及其一部分。

[0243] 标靶相互作用域(TID)

[0244] 本文所公开的开关可以包含一个或多个标靶相互作用域(TID)。本文所公开的开关可以包含两个或更多个标靶相互作用域(TID)。本文所公开的开关可以包含三个或更多个标靶相互作用域(TID)。本文所公开的开关可以包含四个或更多个标靶相互作用域(TID)。本文所公开的开关可以包含5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个标靶相互作用域(TID)。两个或更多个TID可以是相同的。三个或更多个TID中的至少两者可以是相同的。两

个或更多个TID可以是不同的。三个或更多个TID中的至少两者可以是不同的。

[0245] 本文所公开的开关中间物可以包含一个或多个靶相互作用域(TID)。本文所公开的开关中间物可以包含两个或更多个靶相互作用域(TID)。本文所公开的开关中间物可以包含三个或更多个靶相互作用域(TID)。本文所公开的开关中间物可以包含四个或更多个靶相互作用域(TID)。本文所公开的开关中间物可以包含5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个靶相互作用域(TID)。两个或更多个TID可以是相同的。三个或更多个TID中的至少两者可以是相同的。两个或更多个TID可以是不同的。三个或更多个TID中的至少两者可以是不同的。

[0246] 一般来说,TID与靶上或来自靶的分子相互作用。经由非限制性实例,TID可以选自小分子、配体、受体激动剂、受体拮抗剂、酶抑制剂、DNA适体、PNA适体、维生素、底物以及底物类似物。在一些情况下,TID不包含抗体或抗体片段。

[0247] TID可以包含维生素或其衍生物。经由非限制性实例,维生素可以选自维生素A、维生素B、维生素C、维生素D、维生素E以及维生素K。维生素可以是维生素C。维生素可以是维生素D。维生素可以包含叶酸盐或其衍生物。维生素可以是叶酸盐或其衍生物。TID可以是叶酸盐。TID可以包含类维生素。TID可以包含维生素代谢物或维生素前体。经由非限制性实例,类维生素可以选自视黄醇、视黄醛、β胡萝卜素、类胡萝卜素、硫胺素、核黄素、烟酸、烟酰胺、泛酸、吡哆醇、吡哆胺、吡哆醛、生物素、叶酸、亚叶酸、氰钴胺素、羟钴胺素、甲钴胺素、抗坏血酸、胆钙化醇、麦角钙化醇、生育酚、生育三烯酚、叶绿醌以及甲基萘醌或其衍生物。TID可以包含抗氧化剂或其衍生物。

[0248] TID可以是酶抑制剂。经由非限制性实例,TID可以选自酪氨酸激酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、生长因子受体抑制剂、激素受体抑制剂、两面神激酶抑制剂、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂、Bcl-2抑制剂、聚ADP核糖聚合酶(PARP)抑制剂、PI3K抑制剂、Braf抑制剂、MAP激酶抑制剂、周期素依赖性激酶抑制剂以及热休克蛋白抑制剂。酶抑制剂可以选自阿帕替尼(apatinib)、硼替佐米(bortezomib)、伊马替尼(imatinib)、依鲁替尼(ibrutinib)、塞利西利(seliciclib)、博舒替尼(bosutinib)、卡博替尼(cabozantinib)、克唑替尼(crizotinib)、达拉菲尼(dabrafenib)、达沙替尼(dasatinib)、阿霉素(doxorubicin)、埃罗替尼(erlotinib)、依维莫司(everolimus)、吉非替尼(gefitinib)、伊马替尼(imatinib)、依尼帕尼(iniparib)、拉帕替尼(lapatinib)、LEE011、LGX818、米罗替尼(milotinib)、奥巴克拉(obatociclib)、奥拉帕尼(olaparib)、帕唑帕尼(pazopanib)、PD-0332991、哌立福新(perifosine)、帕纳替尼(ponatinib)、瑞格非尼(regorafenib)、鲁索替尼(ruxolitinib)、盐霉素(salinomycin)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、他莫昔芬(tamoxifen)、替西罗莫司(temsirolimus)、托法替尼(tofacitinib)、曲美替尼(trametinib)、凡德他尼(vandetanib)以及威罗菲尼(vemurafenib)或其衍生物。

[0249] TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸或其衍生物。TID可以是足够小的以穿透肿瘤。

[0250] TID可以包含多肽。TID可以基于或来源于多肽。TID可以包含合成多肽。合成多肽可以指并非遗传编码的多肽。TID可以包含天然存在的多肽。天然存在的多肽可以指遗传编码的多肽。多肽可以包含约5个、约10个、约15个、约20个、约25个、约30个、约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个或约90个或更多

个氨基酸。

[0251] TID可以选自10聚体肽激素促黄体激素释放激素、蛙皮素(bombesin)、促性腺激素释放激素、五肽胃泌素(pentagastrin)、cRGD、奥曲肽(octreotide)、奥曲他(octreotate)以及其类似物。TID可以结合与促性腺激素释放激素受体、前列腺特异性膜抗原、c型凝集素样分子、叶酸受体、胆囊收缩素B受体、生长抑素受体、 $\alpha\text{v}\beta 3$ 整合素、胃泌素释放肽受体、神经激肽受体、黑皮质素受体、神经降压素受体、促黄体激素释放激素受体以及神经肽受体至少50%同源的靶。

[0252] TID可以包含基于或来源于选自SEQ ID NO:18-56中的任一者的氨基酸序列的氨基酸序列。TID可以包含与选自SEQ ID NO:18-56中的任一者的氨基酸序列至少60%一致的氨基酸序列。TID可以包含与选自SEQ ID NO:18-56中的任一者的氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列。TID可以包含与选自SEQ ID NO:18-56中的任一者的氨基酸序列至少75%一致的氨基酸序列。TID可以包含与选自SEQ ID NO:18-56中的任一者的氨基酸序列至少80%一致的氨基酸序列。TID可以包含与选自SEQ ID NO:18-56中的任一者的氨基酸序列至少85%一致的氨基酸序列。TID可以包含与选自SEQ ID NO:18-56中的任一者的氨基酸序列至少90%一致的氨基酸序列。TID可以包含与选自SEQ ID NO:18-56中的任一者的氨基酸序列至少95%一致的氨基酸序列。

[0253] TID可以包含胆囊收缩素B受体激动剂。TID可以包含胆囊收缩素B受体拮抗剂(例如,CCK2拮抗剂)。经由非限制性实例,TID可以包含如图7中所描绘的胆囊收缩素B受体拮抗剂。

[0254] TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。如本文所用的术语“抗体片段”指的是除全长形式以外的任何形式的抗体。本文中的抗体片段包括作为存在于全长抗体内的较小组分的抗体,以及已经工程改造的抗体。抗体片段包括(但不限于)Fv、Fc、Fab和(Fab')₂、单链Fv(scFv)、双链抗体、三链抗体、四链抗体、双功能杂交抗体、CDR1、CDR2、CDR3、CDR的组合、可变区、构架区、恒定区、重链、轻链、替代性支架非抗体分子以及双特异性抗体。除非另有特别注明,否则使用术语“抗体”的声明和权利要求书可以特别地包括“抗体片段”。

[0255] TID可以包含抗体或抗体片段,其可以选自Fv、Fc、Fab和(Fab')₂、单链Fv(scFv)、双链抗体、三链抗体、四链抗体、双功能杂交抗体、单克隆溶液TCR、互补决定区1(CDR1)、CDR2、CDR3、CDR的组合、可变区、构架区、恒定区、重链、轻链、替代性支架非抗体分子以及双特异性抗体。多肽可以是免疫球蛋白。多肽可以是Fab。TID可以是单克隆TCR。

[0256] TID可以是人类、完全人类、人源化、人类工程改造、非人类和/或嵌合抗体。可以使非人类抗体人源化以降低对人类的免疫原性,同时保留亲本非人类抗体的特异性和亲和力。一般来说,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中CDR(或其部分)来源于非人类抗体,并且FR(或其部分)来源于人类抗体序列。人源化抗体任选地还包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人类抗体(例如,CDR残基来源于的抗体)的对应残基取代,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0257] TID可以基于或来源于嵌合抗体。嵌合抗体可以指经由原始地编码独立抗体的两个或更多个抗体基因的连接而形成的抗体。嵌合抗体可以包含至少一个来自第一抗体的氨基酸和至少一个来自第二抗体的氨基酸,其中第一和第二抗体是不同的。抗体或抗体片段

的至少一部分可以来自牛物种、人类物种或鼠类物种。抗体或抗体片段的至少一部分可以来自大鼠、山羊、天竺鼠或兔。抗体或抗体片段的至少一部分可以来自人类。抗体或抗体片段抗体的至少一部分可以来自猕猴。

[0258] TID可以基于或来源于来自哺乳动物、鸟、鱼、两栖动物以及爬行动物的抗体或抗体片段。哺乳动物包括(但不限于)食肉动物、啮齿动物、象、有袋动物、兔、蝙蝠、灵长类动物、海豹、食蚁动物、鲸类动物、奇蹄目动物以及偶蹄目动物。哺乳动物可以是人类、非人类灵长类动物、小鼠、绵羊、猫、犬、母牛、马、山羊或猪。

[0259] TID可以基于或来源于选自由抗CD19抗体、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、抗CD22抗体、抗CS1抗体、抗CLL-1抗体、抗CD33抗体以及抗CEA抗体组成的群组的抗体或抗体片段。TID可以基于或来源于抗CD19抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗Her2抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗EGFR抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗EGFRvIII抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗BCMA抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗CD22抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗CS1抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗CLL-1抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗CD33抗体或其片段。TID可以基于或来源于抗CEA抗体或其片段。

[0260] TID可以基于或来源于免疫球蛋白(Ig)。免疫球蛋白可以选自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、其片段或其修饰的型式。免疫球蛋白可以是IgG。IgG可以是IgG1。IgG可以是IgG2。IgG可以具有一个或多个Fc突变用于降低Fc受体(FcR)结合。Fc突变可以在IgG的重链中。IgG1中的Fc突变可以是L234A和L235A。IgG1中的Fc突变可以是L234A和L235E。IgG1中的Fc突变可以是N297A。IgG2中的Fc突变可以是V234A和V237A。TID可以包含无Fc的免疫球蛋白或其片段。

[0261] TID可以包含选自由以下组成的群组的抗体: 贺癌宁(ado-trastuzumab emtansine)、阿仑单抗(alemtuzumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、维布妥昔单抗(brentuximab vedotin)、吉妥珠单抗奥唑米星(gemtuzumab ozogamicin)、伊匹单抗(ipilimumab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)或帕尼单抗(panitumumab)或其片段。在一些情况下,TID不包含西妥昔单抗(cetuximab)。TID可以是爱必妥(erbitux)或其片段。TID可以不是爱必妥。TID可以是利妥昔单抗(rituximab)或其片段。TID可以不是利妥昔单抗。TID可以是曲妥珠单抗(trastuzumab)或其片段。TID可以不是曲妥珠单抗。

[0262] TID可以是抗CD19抗体或其片段。TID可以是抗CD22抗体或其片段。TID可以不是抗CD19抗体或其片段。经由非限制性实例,TID可以靶向选自Her2、CLL-1、CD33、EGFRvIII、CD20、BCMA、CS1或其片段的抗原。抗原可以包含野生型抗原。抗原可以包含一个或多个突变。

[0263] TID可以包含抗CD19抗体或其片段。抗CD19抗体或其片段的轻链可以包含SEQ ID NO:16或同源氨基酸序列。氨基酸序列可以与SEQ ID NO:16约99%、约98%、约97%、约96%、约95%、约92%、约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%或约2%同源。抗CD19抗体或其片段的轻链可以包含SEQ ID NO:17或同源氨基酸序列。氨基酸序列可以与SEQ ID NO:17约99%、约98%、约97%、约96%、约95%、约92%、约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%或约2%同源。

[0264] TID可以是抗BCMA抗体或其片段。TID可以是抗CS1抗体或其片段。TID可以是抗EGFRvIII抗体或其片段。TID可以是抗Her2抗体或其片段。TID可以包含抗CD20抗体或抗体片段。TID可以包含抗CEA抗体或抗体片段。TID可以包含抗EGFR抗体或抗体片段。TID可以包含抗CEA抗体或抗体片段。TID可以包含抗CLL-1抗体或抗体片段。TID可以包含抗CD33抗体或抗体片段。TID可以包含曲妥珠单抗或其片段。TID可以不包含西妥昔单抗或其片段。TID可以不包含曲妥珠单抗或其片段。TID可以不包含利妥昔单抗或其片段。TID可以不包含针对EpCAM的抗体或其片段。TID可以由选自SEQ ID NO:5-9的核苷酸或氨基酸序列编码的抗体或抗体片段,其中非天然氨基酸可以置换抗体或抗体片段的任何氨基酸。

[0265] TID可以是小分子。小分子可以是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸。小分子可以是叶酸盐。CAR-ID可以是FITC或其衍生物。CAR-EC开关可以进一步包含第二TID。CAR-EC开关可以包含多于1个、2个、3个、4个或5个TID。

[0266] TID可以基于或来源于选自由蛋白质A、脂钙蛋白(lipocalin)、纤连蛋白域(fibronectin domain)、锚蛋白共有重复域以及硫氧还蛋白组成的群组的多肽。

[0267] 本文所公开的CAR-EC开关可以包含一个或多个非天然氨基酸。一个或多个CAR-ID可以包含一个或多个非天然氨基酸。一个或多个TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。一个或多个连接子可以包含一个或多个非天然氨基酸。CAR-ID附接至TID可以经由一个或多个非天然氨基酸发生。一个或多个连接子可以使一个或多个CAR-ID经由一个或多个非天然氨基酸位点特异性地连接至一个或多个TID。替代地或另外,一个或多个连接子可以使一个或多个TID位点特异性地连接至一个或多个TID,其中不需要非天然氨基酸来使一个或多个TID连接至一个或多个TID。TID可以连接至TID上的1个、2个、3个、4个、5个或更多个非天然氨基酸。TID可以位点特异性地连接至TID上的1个、2个、3个、4个、5个或更多个非天然氨基酸。或者,TID可以连接至TID上的1个、2个、3个、4个、5个或更多个非天然氨基酸。TID可以位点特异性地连接至TID上的1个、2个、3个、4个、5个或更多个非天然氨基酸。

[0268] 嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)可以包含一个或多个非天然氨基酸。本文所公开的CAR-ID可以包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个非天然氨基酸。TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。本文所公开的靶向抗体或抗体片段可以包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个非天然氨基酸。非天然氨基酸可以与连接子反应以形成化学键。

[0269] 一个或多个非天然氨基酸可以插入TID中的两个天然存在的氨基酸之间。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID中的一个或多个天然存在的氨基酸。一个或多个非天然氨基酸可以并入TID的N端处。一个或多个非天然氨基酸可以并入TID的C端处。非天然氨基酸可以并入与标靶上或来自标靶的分子相互作用的TID的区域远端。非天然氨基酸可以并入与标靶上或来自标靶的分子相互作用的TID的区域附近。非天然氨基酸可以并入与标靶上或来自标靶的分子相互作用的TID的区域中。

[0270] 一个或多个非天然氨基酸可以置换TID中的一个或多个氨基酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID中的任何天然氨基酸。

[0271] 一个或多个非天然氨基酸可以并入TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链中。一个或多个非天然氨基酸可以并入TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链中。一个或多个非天然氨基酸可以并入TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链和轻链中。一个或多个非天然

氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链中的氨基酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链中的氨基酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链和轻链中的氨基酸。

[0272] 一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的丙氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的半胱氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的丝氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的赖氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的天冬酰胺。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的苏氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链的丙氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链的半胱氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链的丝氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链的赖氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链的天冬酰胺。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链的苏氨酸。

[0273] 一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的Ser 202。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链的Lys 136。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的重链的Ala123。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的Ser 202和重链的Lys 136。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID基于或来源于的免疫球蛋白的轻链的Thr 109。非天然氨基酸可以置换多肽基于或来源于的抗体的轻链的氨基酸。举例来说,非天然氨基酸可以置换抗体轻链的丝氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的丝氨酸202或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的甘氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的甘氨酸68或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的苏氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的苏氨酸109或其同源物。多肽可以基于或来源于抗体的重链。非天然氨基酸可以置换抗体重链的赖氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的赖氨酸136或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丙氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丙氨酸123或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丝氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丝氨酸74或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的氨基酸残基和抗体重链的氨基酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的甘氨酸残基和抗体重链的氨基酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的甘氨酸残基和抗体重链的丝氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的丝氨酸残基和抗体轻链的氨基酸残基。抗体轻链的甘氨酸残基可以是甘氨酸68或其同源物。抗体重链的丝氨酸残基可以是丝氨酸74或其同源物。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的丝氨酸残基和抗体重链的氨基酸。非天然氨基酸可以置换抗体轻链的丝氨酸残基和抗体重链的赖氨酸残基。非天然氨基酸可以置换抗体重链的赖氨酸残基和抗体轻链的氨基酸残基。抗体轻链的丝氨酸残基可以是丝氨酸202或其同源物。抗体重链的丝氨酸残基可以是赖氨酸136或其同源物。

[0274] 一个或多个非天然氨基酸可以置换TID的氨基酸,其中TID是抗CD19抗体或其片段。一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的任何丝氨酸。一个或

多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的任何赖氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的任何天冬酰胺。一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的任何苏氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的任何丝氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的任何赖氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的任何天冬酰胺。一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的任何苏氨酸。抗体或抗体片段可以是抗CD19抗体或其片段,其中一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的一个或多个氨基酸。抗CD19抗体或其片段的轻链可以包含SEQ ID NO:16。一个或多个非天然氨基酸可以置换SEQ ID NO:16的一个或多个氨基酸。SEQ ID NO:16的一个或多个氨基酸可以选自包含G68、K107、T109、E152、S156、K169以及S202的群组。一个或多个非天然氨基酸可以置换抗CD19抗体或其片段的轻链的一个或多个氨基酸。抗CD19抗体或其片段的轻链可以包含SEQ ID NO:17。一个或多个非天然氨基酸可以置换SEQ ID NO:17的一个或多个氨基酸。SEQ ID NO:17的一个或多个氨基酸可以选自S74、A121以及K136组成的群组。

[0275] 一个或多个非天然氨基酸可以由不编码二十个天然氨基酸之一的密码子编码。一个或多个非天然氨基酸可以由无义密码子(终止密码子)编码。终止密码子可以是琥珀密码子。琥珀密码子可以包含UAG序列。终止密码子可以是赭石密码子。赭石密码子可以包含UAA序列。终止密码子可以是乳白或棕土密码子。乳白或棕土密码子可以包含UGA序列。一个或多个非天然氨基酸可以由四碱基密码子编码。

[0276] 一个或多个非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF或pAcPhe)。一个或多个非天然氨基酸可以是硒代半胱氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以是对氟苯丙氨酸(pFPhe)。一个或多个非天然氨基酸可以选自包含以下的群组:对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)、对叠氮基甲基苯丙氨酸(pAzCH₂F)、对苯甲酰基苯丙氨酸(pBpF)、对炔丙氧基苯丙氨酸(pPrF)、对碘苯丙氨酸(pIF)、对氰基苯丙氨酸(pCNF)、对羧甲基苯丙氨酸(pCmF)、3-(2-萘基)丙氨酸(NapA)、对二羟硼基苯丙氨酸(pBoF)、邻硝基苯丙氨酸(oNiF)、(8-羟基喹啉-3-基)丙氨酸(HQA)、硒代半胱氨酸以及(2,2'-联吡啶-5-基)丙氨酸(BipyA)。一个或多个非天然氨基酸可以是4-(6-甲基-s-四嗪-3-基)氨基苯丙氨酸。

[0277] 一个或多个非天然氨基酸可以是 β -氨基酸(β 3和 β 2)、高氨基酸、脯氨酸和丙酮酸衍生物、3-取代的丙氨酸衍生物、甘氨酸衍生物、环取代的苯丙氨酸和酪氨酸衍生物、线性核心氨基酸、二氨基酸、D-氨基酸、N-甲基氨基酸或其组合。

[0278] 非天然氨基酸的额外实例包括(但不限于):1)各种取代的酪氨酸和苯丙氨酸类似物,诸如O-甲基-L-酪氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、3-硝基-L-酪氨酸、对硝基-L-苯丙氨酸、间甲氧基-L-苯丙氨酸以及对异丙基-L-苯丙氨酸;2)具有可以光交联的芳基叠氮和二苯甲酮基团的氨基酸;3)具有独特的化学反应性的氨基酸,包括乙酰基-L-苯丙氨酸和间乙酰基-L-苯丙氨酸、O-烯丙基-L-酪氨酸、O-(2-丙炔基)-L-酪氨酸、对乙基硫羰基-L-苯丙氨酸以及对(3-氧代丁酰基)-L-苯丙氨酸;4)用于在X射线结晶学中定相的含重原子的氨基酸,包括对碘和对溴-L-苯丙氨酸;5)氧化还原活性氨基酸二羟基-L-苯丙氨酸;6)糖基化氨基酸,包括b-N-乙酰葡萄糖胺-O-丝氨酸和a-N-乙酰半乳糖胺-O-苏氨酸;7)具有萘基、丹磺酰基以及7-氨基香豆素侧链的荧光氨基酸;8)具有偶氮苯和硝基苯甲基Cys、Ser以及Tyr侧链的可

光裂解和可光异构的氨基酸;9)磷酸酪氨酸模拟物对羧甲基-L-苯丙氨酸;10)谷氨酰胺同系物高谷氨酰胺;以及11)2-氨基辛酸。可以修饰非天然氨基酸以并入化学基团。可以修饰非天然氨基酸以并入酮基。

[0279] 一个或多个非天然氨基酸可以包含至少一个肟、羰基、二羰基、羟胺基或其组合。一个或多个非天然氨基酸可以包含至少一个羰基、二羰基、烷氧基-胺、肟、非环状烯烃、非环状炔烃、环辛炔、芳基/烷基叠氮、降冰片烯、环丙烯、反式环辛烯或四嗪官能团或其组合。

[0280] 一个或多个非天然氨基酸可以通过本领域中已知的方法并入TID和/或CAR-ID中。基于细胞的或无细胞系统可以用于改变TID和/或CAR-ID的遗传序列,从而产生具有一个或多个非天然氨基酸的TID和/或CAR-ID。营养缺陷株可以用于替代工程改造的tRNA和合成酶。一个或多个非天然氨基酸可以经由一个或多个天然氨基酸的选择性反应而产生。选择性反应可以由一种或多种酶介导。在一个非限制性实例中,一个或多个半胱氨酸与甲酰甘氨酸生成酶(FGE)的选择性反应可以产生一个或多个甲酰甘氨酸(参看Rabuka等,《自然实验手册(Nature Protocols)》7:1052-1067(2012),其以全文引用的方式并入)。

[0281] 一个或多个非天然氨基酸可以参与化学反应以形成连接子。用以形成连接子的化学反应可以是生物正交反应。用以形成连接子的化学反应可以是点击化学。

[0282] 额外的非天然氨基酸在以下文献中公开:Liu等(《生物化学年评(Annu Rev Biochem)》,79:413-44,2010)、Wang等(《应用化学(Angew Chem Int Ed)》,44:34-66,2005)以及PCT申请号PCT/US2012/039472、PCT/US2012/039468、PCT/US2007/088009、PCT/US2009/058668、PCT/US2007/089142、PCT/US2007/088011、PCT/US2007/001485、PCT/US2006/049397、PCT/US2006/047822和PCT/US2006/044682,其全部以全文引用的方式并入。

[0283] 本领域的技术人员将预见,CAR-EC平台可以扩展至在疾病或病状中靶向的细胞上的多种分子。经由非限制性实例,本文所公开的CAR-EC开关可以包含基于或来源于靶向以下的抗体的TID:结肠和肺癌的EGFR、胶质瘤和成胶质细胞瘤的EGFRvIII、多发性骨髓瘤的BCMA和CS1、以及急性髓系白血病的CLL-1和CD33。本文所公开的CAR-EC开关可以包含有包含用于靶向癌细胞的小分子的TID。包含有包含叶酸盐的TID的CAR-EC开关可以用于治疗卵巢癌。包含有包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸的TID的CAR-EC开关可以用于治疗PSMA阳性前列腺癌细胞。

[0284] 连接子

[0285] 本文所公开的开关可以包含一个或多个连接子。本文所公开的开关可以包含两个或更多个连接子。本文所公开的开关可以包含三个或更多个连接子。本文所公开的开关可以包含四个或更多个连接子。本文所公开的开关可以包含5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个连接子。两个或更多个连接子可以是相同的。三个或更多个连接子中的至少两者可以是相同的。两个或更多个连接子可以是不同的。三个或更多个连接子中的至少两者可以是不同的。

[0286] 本文所公开的开关中间物可以包含一个或多个连接子。本文所公开的开关中间物可以包含两个或更多个连接子。本文所公开的开关中间物可以包含三个或更多个连接子。本文所公开的开关中间物可以包含四个或更多个连接子。本文所公开的开关中间物可以包含5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个连接子。两个或更多个连接子可以是相同的。三个

或更多个连接子中的至少两者可以是相同的。两个或更多个连接子可以是不同的。三个或更多个连接子中的至少两者可以是不同的。

[0287] 图18描绘了例示性连接子。图19描绘了例示性异双功能连接子。图20示出了合成双功能连接子的一般方案。额外的例示性连接子和构建连接子的方法可以在W02014/153002中找到,其以全文引用的方式并入。

[0288] 连接子可以附接至嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。连接子可以附接至标靶相互作用域(TID)。连接子可以使CAR-ID附接至TID。一个或多个连接子可以使一个或多个CAR-ID附接至一个或多个TID。一个或多个连接子可以使一个或多个CAR-ID按位点特异性方式附接至一个或多个TID。按位点特异性方式附接可以包括使一个或多个CAR-ID附接至一个或多个TID上的预定位点。替代地或另外,按位点特异性方式附接可以包括使一个或多个CAR-ID附接至一个或多个TID中的非天然氨基酸。一个或多个连接子可以使一个或多个CAR-ID按位点非依赖性方式附接至一个或多个TID。按位点非依赖性方式附接可以包括使一个或多个CAR-ID附接至一个或多个TID上的随机位点。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至1个、2个、3个、4个、5个或更多个TID。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至1个、2个、3个、4个、5个或更多个TID。或者,TID可以按位点特异性方式附接至1个、2个、3个、4个、5个或更多个CAR-ID。按位点特异性方式附接可以包括使一个或多个TID附接至一个或多个CAR-ID上的预定位点。TID可以按位点非依赖性方式附接至1个、2个、3个、4个、5个或更多个CAR-ID。按位点非依赖性方式附接可以包括使一个或多个TID附接至一个或多个CAR-ID上的随机位点。

[0289] 一个或多个连接子可以偶合至CAR-ID、TID或其组合。一个或多个连接子可以偶合至CAR-ID以形成式IIA:L1-X或式II:X-L1的一个或多个开关中间物,其中X是CAR-ID并且L1是连接子。一个或多个连接子可以经由脞偶合至CAR-ID。一个或多个连接子可以经由环辛炔、环丙烯、芳基/烷基叠氮、反式环辛烯、降冰片烯、四嗪或其组合偶合至CAR-ID。一个或多个连接子可以经由共价键、非共价键、离子键或其组合偶合至CAR-ID。一个或多个连接子可以偶合至TID以形成式IIIA:L1-Y或式III:Y-L1的一个或多个开关中间物,其中Y是TID并且L1是连接子。一个或多个连接子可以经由脞偶合至TID。一个或多个连接子可以经由环辛炔、环丙烯、芳基/烷基叠氮、反式环辛烯、降冰片烯、四嗪或其组合偶合至TID。一个或多个连接子可以经由共价键、非共价键、离子键或其组合偶合至TID。

[0290] TID可以包含一个或多个氨基酸。一个或多个氨基酸可以包含天然氨基酸。连接子可以与TID上的一个或多个天然氨基酸偶合。一个或多个氨基酸可以包含一个或多个非天然氨基酸。连接子可以与TP上的一个或多个非天然氨基酸偶合。连接子可以与作为位点特异性诱变的产物的氨基酸偶合。连接子可以与作为位点特异性诱变的产物的半胱氨酸偶合。连接子(例如,经取代的马来酰亚胺)可以与作为位点特异性诱变的产物的半胱氨酸以及原生半胱氨酸残基偶合。各自具有互补反应性官能团的两个连接子可以彼此偶合。

[0291] 一个或多个连接子可以是可裂解连接子。一个或多个连接子可以是不可裂解连接子。一个或多个连接子可以是柔性连接子。一个或多个连接子可以是非柔性连接子。连接子可以是双功能连接子。双功能连接子可以在一端上包含第一官能团并且在第二端上包含第二官能团。双功能连接子可以是异双功能连接子。异双功能连接子可以在一端上包含第一官能团并且在第二端上包含第二官能团,其中第一官能团和第二官能团是不同的。双功能

连接子可以是同双功能连接子。同双功能连接子可以在一端上包含第一官能团并且在另一端上包含第二官能团,其中第一官能团和第二官能团是相同的。

[0292] 连接子可以包含化学键。连接子可以包含官能团。连接子可以包含聚合物。聚合物可以是聚乙二醇。连接子可以包含氨基酸。

[0293] 连接子可以包含一个或多个官能团。连接子可以包含两个或更多个官能团。连接子可以包含三个或更多个官能团。连接子可以包含四个或更多个官能团。连接子可以包含5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个官能团。连接子可以是双功能乙二醇连接子。

[0294] 连接子可以包含乙二醇。连接子可以包含约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个或约20个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含4个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含8个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含10个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含12个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含15个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含20个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含25个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含30个或更多个乙二醇亚单元。连接子可以包含35个或更多个乙二醇亚单元。

[0295] 连接子可以包含聚乙二醇(PEG)。连接子可以包含约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个或约20个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含4个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含8个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含10个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含12个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含15个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含20个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含25个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含30个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含35个或更多个聚乙二醇(PEG)亚单元。

[0296] 连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。

[0297] 连接子可以包含芳基或杂芳基。连接子可以包含芳基。芳基可以是苯基。苯基可以被二取代。二取代的苯基可以是1,4-二取代的苯基。二取代的苯基可以是1,3-二取代的苯基。苯基可以被三取代。苯基可以被四取代。经取代的苯基的取代基中的两者可以是NO₂。在一些情况下,连接子不包含苯甲基取代基。

[0298] 连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含2个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含3个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含4个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含5个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含6个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含7个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含8个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含9个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含10个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含11个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含12个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含13个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。连接子可以包含14个或更多个聚乙二醇(PEG)单元。

[0299] 连接子可以在一端上包含酰胺。连接子可以在一端上包含酰胺并且在另一端上包

含胺。连接子可以在一端上包含酰胺并且在另一端上包含三唑。

[0300] 一个或多个连接子可以包含1,4-二羧基部分。一个或多个连接子可以包含1,3-二硝基取代的苯基部分。

[0301] 一个或多个连接子可以包含一个或多个反应性官能团。反应性官能团可以与偶合伴侣上的互补反应性官能团反应。连接子上的反应性官能团与偶合伴侣上的互补反应性官能团的反应可以在连接子并入CAR-EC开关中之前发生。

[0302] 连接子可以包含至少一个选自以下的反应性官能团：烷氧基-胺、肼、芳基/烷基叠氮、炔烃、烯烃、四嗪、二氯三嗪、三氟乙磺酸酯(tresylate)、琥珀酰亚胺基碳酸酯、苯并三唑碳酸酯、硝基苯基碳酸酯、三氯苯基碳酸酯、羰基咪唑、琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、马来酰亚胺、乙烯砜、卤代乙酰胺以及二硫化物。烯烃可以选自降冰片烯、反式环辛烯以及环丙烯。连接子可以包含至少一个烷氧基胺。连接子可以包含至少一个叠氮。连接子可以包含至少一个环辛炔。连接子可以包含至少一个四嗪。

[0303] 一个或多个连接子可以在一个或多个末端处包含烷氧基-胺(或氨氧基)基团、叠氮基和/或环辛炔基。一个或多个连接子可以在一个末端处包含烷氧基-胺并且在另一个末端处包含叠氮基。一个或多个连接子可以在一个末端处包含烷氧基-胺并且在另一个末端处包含环辛炔基。烷氧基-胺可以与氨基酸上的酮基形成稳定的脞。烷氧基-胺可以与非天然氨基酸上的酮基形成稳定的脞。酮基可以在对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)上。

[0304] 一个或多个连接子可以通过CAR-ID上的反应性官能团与附接至TID的连接子的互补反应性官能团反应而形成。一个或多个连接子可以通过TID上的氨基酸或另一个反应性官能团与附接至CAR-ID的连接子的互补反应性官能团反应而形成。一个或多个连接子可以通过附接至CAR-ID的连接子与附接至TID的另一个连接子反应而形成。图16示出了通过两个开关中间物上的反应性官能团反应而产生连接子的示意图。如图16中所示,包含CAR-ID(1605)和第一连接子(1610)的第一开关中间物(1601)与包含TID(1625)和第二连接子(1630)的第二开关中间物(1620)接触。第一连接子(1610)的反应性官能团(1615)与第二连接子(1630)的第二官能团(1635)反应以产生新连接子(1645)。两个开关中间物(1601、1620)的反应得以形成包含经由新连接子(1645)连接至TID(1625)的CAR-ID(1605)的开关(1640)。

[0305] 连接子可以是生物正交反应的产物。举例来说,含有酮、叠氮、炔烃、烯烃以及四嗪侧链的氨基酸可以响应无义和移码密码子进行遗传编码。这些侧链可以充当生物正交偶联反应的化学把柄(Kim等,《化学生物学新观点(Curr Opin Chem Bio)》17:412-419(2013),其以全文引用的方式并入)。连接子可以包含脞、四唑、狄尔斯-阿尔德加合物(Diels Alder adduct)、杂狄尔斯-阿尔德加合物、芳香族取代反应产物、亲核取代反应产物、酯、酰胺、氨基甲酸酯、醚、硫醚或迈克尔反应产物(Michael reaction product)。连接子可以是环加成产物、复分解反应产物、金属介导的交叉偶合反应产物、自由基聚合产物、氧化偶合产物、酰基转移反应产物或光点击反应产物。环加成可以是胡伊斯根环加成(Huisgen-环加成)。环加成可以是无铜[3+2]胡伊斯根环加成。环加成可以是狄尔斯-阿尔德反应。环加成可以是杂狄尔斯-阿尔德反应。连接子可以是酶介导的反应的产物。连接子可以是转谷氨酰胺酶介导的反应的产物,其非限制性实例描述于Lin等,《美国化学会志(J. Am. Chem. Soc.)》128: 4542-4543(2006)和WO 2013/093809中。连接子可以包含连接两个半胱氨酸残基的二硫桥,

诸如PolyTherics的ThioBridge™技术。连接子可以包含连接两个氨基酸残基的马来酰亚胺桥。连接子可以包含连接两个半胱氨酸残基的马来酰亚胺桥。

[0306] 两个或更多个连接子可以连接。两个或更多个连接子可以经由一个或多个无铜反应连接。两个或更多个连接子可以经由一个或多个环加成连接。两个或更多个连接子可以经由一个或多个胡伊斯根环加成连接。两个或更多个连接子可以经由一个或多个无铜[3+2]胡伊斯根环加成连接。两个或更多个连接子可以经由一个或多个含铜反应连接。两个或更多个连接子可以经由一个或多个狄尔斯-阿尔德反应连接。两个或更多个连接子可以经由一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应连接。

[0307] CAR-EC开关可以通过调整连接子长度而优化。CAR-EC开关可以包含不同长度的连接子。连接子可以是相对短的。连接子可以是相对长的。一个或多个连接子的长度可以介于约1 埃 (Å) 至约120 埃 (Å) 之间。一个或多个连接子的长度可以介于约5 埃 (Å) 至约105 埃 (Å) 之间。一个或多个连接子的长度可以介于约10 埃 (Å) 至约100 埃 (Å) 之间。一个或多个连接子的长度可以介于约10 埃 (Å) 至约90 埃 (Å) 之间。一个或多个连接子的长度可以介于约10 埃 (Å) 至约80 埃 (Å) 之间。一个或多个连接子的长度可以介于约10 埃 (Å) 至约70 埃 (Å) 之间。一个或多个连接子的长度可以介于约15 埃 (Å) 至约45 埃 (Å) 之间。一个或多个连接子的长度可以等于或大于约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27、30 埃或更大。一个或多个连接子的长度可以等于或大于约10 埃。一个或多个连接子的长度可以等于或大于约15 埃。一个或多个连接子的长度可以等于或大于约20 埃。一个或多个连接子的长度可以等于或小于约110、100、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30 埃或更小。一个或多个连接子的长度可以等于或小于约100 埃。一个或多个连接子的长度可以等于或小于约80 埃。一个或多个连接子的长度可以等于或小于约60 埃。一个或多个连接子的长度可以等于或小于约40 埃。

[0308] 连接子的总长度可以介于约1 埃 (Å) 至约120 埃 (Å) 之间。连接子的总长度可以介于约5 埃 (Å) 至约105 埃 (Å) 之间。连接子的总长度可以介于约10 埃 (Å) 至约100 埃 (Å) 之间。连接子的总长度可以介于约10 埃 (Å) 至约90 埃 (Å) 之间。连接子的总长度可以介于约10 埃 (Å) 至约80 埃 (Å) 之间。连接子的总长度可以介于约10 埃 (Å) 至约70 埃 (Å) 之间。连接子的总长度可以介于约15 埃 (Å) 至约45 埃 (Å) 之间。连接子的总长度可以等于或大于约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27、30 埃或更大。连接子的总长度可以等于或大于约10 埃。连接子的总长度可以等于或大于约15 埃。连接子的总长度可以等于或大于约20 埃。连接子的总长度可以等于或小于约110、100、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30 埃或更小。连接子的总长度可以等于或小于约100 埃。连接子的总长度可以等于或小于约80 埃。连接子的总长度可以等于或小于约60 埃。连接子的总长度可以等于或小于约40 埃。连接子的总长度可以等于或小于约25 Å。CAR-ID与TID之间的距离可以为约30 Å。

[0309] 本文公开了包含多个开关的组合物,其中这多个开关的开关包含(a)CAR-ID;(b)TID;以及(c)连接子,其中多个开关的至少约60%的开关是结构上均质的。多个开关的至少约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%或69%的开关可以是结构上均质的。多个开关的至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%或79%的开关可以是结构上均质的。多个开关的至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%的开关可以是结构上均质的。多个开关的至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的开关可以是结构上均质的。通过位点特异性地连接CAR-ID和TID可以提供结构上均质的CAR-EC开关。连接子可以位点特异性地连接至CAR-ID。连接子可以位点特异性地连接至TID。连接子的第一位点可以位点特异性地连接至CAR-ID并且连接子的第二位点可以位点特异性地连接至TID。

[0310] 产生开关和开关中间物的方法

[0311] 本文公开了产生CAR-EC开关的方法。一般来说,这种方法包括使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)附接至靶相互作用域(TID)。或者,这种方法可以包括使包含CAR-ID和连接子的开关中间物附接至TID。这种方法可以包括使包含TID和连接子的开关中间物附接至CAR-ID。这种方法可以包括使包含CAR-ID和第一连接子的第一开关中间物附接至包含TID和第二连接子的第二开关。CAR-ID附接至TID可以按位点特异性方式发生。按位点特异性方式附接可以包括使CAR-ID附接至TID上的预定位点。按位点特异性方式附接可以包括使TID附接至CAR-ID上的预定位点。CAR-ID附接至TID可以按位点非依赖性方式发生。按位点非依赖性方式附接可以包括使CAR-ID附接至TID上的随机位点。按位点非依赖性方式附接可以包括使TID附接至CAR-ID上的随机位点。这种方法可以进一步包括使一个或多个额外的CAR-ID附接至TID。这种方法可以进一步包括使或多个额外的TID附接至CAR-ID。这种方法可以进一步包括使用一个或多个额外的连接子以使TID连接至CAR-ID。使CAR-ID附接至TID可以包括进行一个或多个化学反应。

[0312] 产生开关的方法可以包括使基于或来源于抗体或抗体片段的TID连接至CAR-ID或包含CAR-ID的开关中间物以产生包含以下的CAR-EC开关:(a)TID;(b)一个或多个连接子;以及(c)CAR-ID,这一个或多个连接子可以使TID连接至CAR-ID。使TID连接至CAR-ID可以按位点特异性方式发生。CAR-ID可以经由一个或多个连接子附接至TID上的预定位点。TID可以经由一个或多个连接子附接至CAR-ID上的预定位点。

[0313] 本文公开了产生式I:X-L1-Y或式IA:Y-L1-X的开关的方法,其中X是嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID),Y是靶相互作用域(TID)并且L1是连接子。X可以是CAR结合小分子并且Y可以是抗体或抗体片段。X可以是不包含肽的CAR结合小分子并且Y可以是不包含抗体或抗体片段的肽。X可以是不包含肽的CAR结合小分子并且Y可以是不包含肽的靶向小分子。这种方法可以包括进行一个或多个反应以使CAR-ID附接至TID中的预定位点。进行一个或多个反应以使CAR-ID附接至TID可以包括混合多个CAR-ID与多个TID。这种方法可以包括使连接子的一端附接至TID,继而使连接子的另一端附接至CAR-ID。这种方法可以包括使连接子的一端附接至CAR-ID,继而使连接子的另一端附接至TID。连接子附接至TID可以按位点特异性方式发生。连接子可以附接至TID的预定氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。连接子可以包含与氨基酸相互作用的官能团。连接子附接至TID可以按位点非依赖性方式发生。连接子可以随机地附接至TID。连接子可以包含与TID中的官能团反应的官能团。连接子附

接至CAR-ID可以按位点特异性方式发生。连接子附接至CAR-ID可以按位点非依赖性方式发生。连接子可以包含与CAR-ID中的官能团反应的官能团。进行一个或多个反应以使CAR-ID附接至TID可以包括进行肽接合。

[0314] 替代地或另外,这种方法可以包括进行反应以使连接子或连接子前体附接至CAR-ID以产生包含偶联至CAR-ID的连接子的开关中间物。开关中间物可以具有式II:X-L1或式IIA:L1-X,其中X是CAR-ID并且L1是连接子或连接子前体。连接子可以按位点特异性方式偶联至CAR-ID。连接子可以按位点非依赖性方式偶联至CAR-ID。进行一个或多个反应以使CAR-ID附接至TID可以包括使开关中间物的连接子部分附接至TID。进行一个或多个反应以使CAR-ID附接至TID可以包括使包含偶联至CAR-ID的连接子或连接子前体的多个开关中间物与多个TID接触。开关中间物的连接子部分附接至TID可以按位点特异性方式发生。TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。开关的连接子部分可以经由一个或多个非天然氨基酸附接至TID。开关中间物的连接子部分的附接可以按位点非依赖性方式发生。

[0315] 替代地或另外,这种方法可以包括进行反应以使连接子或连接子前体附接至TID以产生包含偶联至TID的连接子或连接子前体的开关中间物。开关中间物可以具有式III:Y-L1或式IIIA:L1-Y,其中Y是TID并且L1是连接子或连接子前体。连接子可以按位点特异性方式偶联至TID。连接子可以按位点非依赖性方式偶联至TID。进行一个或多个反应以使CAR-ID附接至TID可以包括使开关中间物的连接子部分附接至CAR-ID。进行一个或多个反应以使CAR-ID附接至TID可以包括使包含偶联至TID的连接子或连接子前体的多个开关中间物与多个CAR-ID接触。开关中间物的连接子部分附接至CAR-ID可以按位点特异性方式发生。开关中间物的连接子部分的附接可以按位点非依赖性方式发生。

[0316] 这种方法可以包括使一个或多个连接子偶合至TID以产生式III:Y-L1或式IIIA:L1-Y的开关中间物,其中Y是TID并且L1是连接子;以及使开关中间物偶联至CAR-ID,从而产生CAR-EC开关。开关中间物可以按位点特异性方式偶联至CAR-ID。开关中间物可以按位点非依赖性方式偶联至CAR-ID。这种方法可以进一步包括将一个或多个非天然氨基酸并入CAR-ID和/或TID中。开关中间物可以经由使用非天然氨基酸按位点特异性方式偶联至CAR-ID。

[0317] 这种方法可以包括使一个或多个连接子偶合至CAR-ID以产生式II:X-L1或式IIA:L1-X的开关中间物,其中X是CAR-ID并且L1是连接子;以及使开关中间物偶联至TID,从而产生CAR-EC开关。开关中间物可以按位点特异性方式偶联至TID。开关中间物可以按位点非依赖性方式偶联至TID。这种方法可以进一步包括将一个或多个非天然氨基酸并入CAR-ID和/或TID中。开关中间物可以经由使用非天然氨基酸按位点特异性方式偶联至TID。

[0318] 使式II:X-L1或式IIA:L1-X(其中X是CAR-ID并且L1)的开关中间物偶联至TID可以包括形成肽。使式III:Y-L1或式IIIA:L1-Y(其中Y是TID并且L1)的开关中间物偶联至CAR-ID可以包括形成肽。形成肽可以包括在酸性条件下进行一个或多个反应。形成肽可以包括在微酸性条件下进行一个或多个反应。形成肽可以包括在微中性条件下进行一个或多个反应。

[0319] 产生开关的方法可以包括(a)产生包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID);(b)使第一连接子附接至TID以产生包含TID和第一连接子的第一开关中间物;(c)使包含嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)和第二连接子的第二开关中间物附接至第一开关中间物,

从而产生开关。非天然氨基酸可以是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。第一连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。第一连接子可以包含环辛炔。第一连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。第一连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。第一连接子可以包含叠氮-PEG-氨基连接子。第一连接子可以衔接至非天然氨基酸的酮。第一连接子可以经由肟接合衔接至TID。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以包含FITC。第二连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。第二连接子可以包含环辛炔。第二连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。第二连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。第二连接子可以是PEG-环辛炔连接子。第二开关中间物可以经由点击化学反应衔接至第一开关中间物。第二开关中间物可以经由环加成反应衔接至第一开关中间物。环加成反应可以是[3+2]环加成反应。

[0320] 使连接子偶联至CAR-ID以产生开关可以包括在连接子与CAR-ID之间形成一个或多个键。使连接子偶联至TID以产生开关可以包括在连接子与TID之间形成一个或多个键。一个或多个键可以包含离子键、共价键、非共价键或其组合。使连接子偶联CAR-ID和TID的额外方法可以如Roberts等,《先进药物输送评论(Advanced Drug Delivery Reviews)》54:459-476(2002)中所描述来进行,其以全文引用的方式包括在内。

[0321] CAR-ID可以包含本文所公开的CAR-ID中的任一者。举例来说,CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以包含FITC。CAR-ID可以选自由DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯膦酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素以及其衍生物组成的群组。TID可以包含本文所公开的TID中的任一者。举例来说,TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐。TID可以基于或来源于抗体或抗体片段。抗体或抗体片段可以包含抗CD19。抗体或抗体片段可以选自由抗CD20、抗CD22、抗CD33、抗BMSA、抗CEA、抗CLL1、抗CS1、抗EGFR以及抗Her2组成的群组。连接子可以包含本文所公开的连接子中的任一者。举例来说,连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基、环辛炔基或其组合。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个PEG亚单元。

[0322] 本文公开了产生式IV:X-L1-L2-Y的开关的方法,其中X是CAR-ID,L1是第一连接子,L2是第二连接子,并且Y是TID。这种方法可以包括(a)使L1偶合至X以产生式II:X-L1的第一开关中间物;(b)使L2偶合至Y以产生式V:L2-Y的第二开关中间物;以及(c)使式II的第一开关中间物连接至式V的第二开关中间物,从而产生式IV的开关。

[0323] 本文公开了产生式IVA:Y-L2-L1-X的开关的方法,其中Y是TID,L1是第一连接子,

L2是第二连接子,并且X是CAR-ID。这种方法可以包括(a)使L1偶合至X以产生式IIA:L1-X的第一开关中间物;(b)使L2偶合至Y以产生式VA:Y-L2的第二开关中间物;以及(c)使式IIA的第一中间物连接至式VA的第二中间物,从而产生式IVA的CAR-EC开关。

[0324] 这些方法可以进一步包括将一个或多个非天然氨基酸并入X和/或Y中。L1可以按位点特异性方式偶合至X。L1可以经由一个或多个非天然氨基酸按位点特异性方式偶合至X。L2可以按位点特异性方式偶合至Y。L2可以经由一个或多个非天然氨基酸按位点特异性方式偶合至Y。这种方法可以进一步包括修饰编码X的核酸以产生X中的一个或多个琥珀密码子。这种方法可以进一步包括修饰编码Y的核酸以产生Y中的一个或多个琥珀密码子。

[0325] 使连接子偶联至CAR-ID以产生第一开关中间物可以包括在连接子与CAR-ID之间形成一个或多个键。使连接子偶联至TID以产生第二开关中间物可以包括在连接子与TID之间形成一个或多个键。一个或多个键可以包含离子键、共价键、非共价键或其组合。使连接子偶联CAR-ID和TID的额外方法可以如Roberts等,《先进药物输送评论(Advanced Drug Delivery Reviews)》54:459-476(2002)中所描述来进行,其以全文引用的方式包括在内。

[0326] 使第一开关中间物连接至第二开关中间物可以包括胡伊斯根环加成、狄尔斯-哈尔德反应(Diels-Halder reaction)、杂狄尔斯-阿尔德反应或酶介导的反应。使第一开关中间物连接至第二开关中间物可以产生肟、四唑、狄尔斯-阿尔德加合物、杂狄尔斯-阿尔德加合物、芳香族取代反应产物、亲核取代反应产物、酯、酰胺、氨基甲酸酯、醚、硫醚、迈克尔反应产物、环加成产物、复分解反应产物、金属介导的交叉偶合反应产物、自由基聚合产物、氧化偶合产物、酰基转移反应产物或光点击反应产物。使第一开关中间物连接至第二开关中间物可以产生二硫桥或马来酰亚胺桥。

[0327] L1和/或L2可以包含选自双功能连接子、可裂解连接子、不可裂解连接子、乙二醇连接子、双功能乙二醇连接子、柔性连接子或非柔性连接子的连接子。L1和/或L2可以包含选自包含环辛炔、环丙烯、芳基/烷基叠氮、反式环辛烯、降冰片烯以及四嗪的群组的连接子。L1的末端和/或L2的末端可以包含烷氧基-胺。L1的末端和/或L2的末端可以包含叠氮或环辛炔基。X可以经由选自环辛炔、环丙烯、芳基/烷基叠氮、反式环辛烯、降冰片烯以及四嗪的化学基团偶合至L1。使第一开关中间物(X-L1或L1-X)和第二开关中间物(Y-L2或L2-Y)连接可以包括进行一个或多个无铜反应。使第一开关中间物(X-L1或L1-X)和第二开关中间物(Y-L2或L2-Y)连接可以包括进行一个或多个含铜反应。使第一开关中间物(X-L1或L1-X)和第二开关中间物(Y-L2或L2-Y)连接可以包括一个或多个环加成。使第一开关中间物(X-L1或L1-X)和第二开关中间物(Y-L2或L2-Y)连接可以包括一个或多个胡伊斯根环加成。使第一开关中间物(X-L1或L1-X)和第二开关中间物(Y-L2或L2-Y)连接可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物(X-L1或L1-X)和第二开关中间物(Y-L2或L2-Y)连接可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。

[0328] 本文所公开的方法可以包括使一个或多个连接子偶合至一个或多个TID、CAR-ID或其组合以产生一个或多个开关中间物。开关中间物可以包含衔接至连接子的TID(例如,TID开关中间物)。开关中间物可以包含衔接至连接子的CAR-ID(例如,CAR-ID开关中间物)。这些方法可以包括使第一连接子偶合至TID以产生TID开关中间物。这些方法可以包括使连接子偶合至CAR-ID以产生CAR-ID开关中间物。

[0329] 一个或多个连接子偶合至TID和CAR-ID可以同时发生。一个或多个连接子偶合至

TID和CAR-ID可以依序发生。一个或多个连接子偶合至TID和CAR-ID可以在单个反应体积中发生。一个或多个连接子偶合至TID和CAR-ID可以在两个或更多个反应体积中发生。

[0330] 使一个或多个连接子偶合至TID和/或CAR-ID可以包括在连接子与TID和/或CAR-ID之间形成一个或多个酐。使一个或多个连接子偶合至TID和/或CAR-ID可以包括在连接子与TID和/或CAR-ID之间形成一个或多个稳定的键。使一个或多个连接子偶合至TID和/或CAR-ID可以包括在连接子与TID和/或CAR-ID之间形成一个或多个共价键。使一个或多个连接子偶合至TID和/或CAR-ID可以包括在连接子与TID和/或CAR-ID之间形成一个或多个非共价键。使一个或多个连接子偶合至TID和/或CAR-ID可以包括在连接子与TID和/或CAR-ID之间形成一个或多个离子键。

[0331] 使一个或多个连接子偶合至TID和/或CAR-ID可以包括使一个或多个连接子位点特异性地偶合至TID和/或CAR-ID。位点特异性偶合可以包括使一个或多个连接子连接至TID和/或CAR-ID的非天然氨基酸。使一个或多个连接子连接至TID和/或CAR-ID的非天然氨基酸可以包括形成酐。经由非限制性实例,使一个或多个连接子连接至TID和/或CAR-ID的非天然氨基酸可以包括使一个或多个连接子的羟胺与氨基酸的醛或酮反应。氨基酸可以是非天然氨基酸。

[0332] 进行一个或多个反应以使CAR-ID位点特异性地连接至TID、使连接子或连接子前体位点特异性地附接至CAR-ID、使连接子或连接子前体位点特异性地附接至TID、使CAR-ID开关中间物位点特异性地附接至TID、使TID开关中间物位点特异性地附接至CAR-ID或使TID开关中间物位点特异性地附接至CAR-ID开关中间物可以包括进行一个或多个选自以下的反应:无铜反应、环加成、胡伊斯根环加成、无铜[3+2]胡伊斯根环加成、含铜反应、狄尔斯-阿尔德反应、杂狄尔斯-阿尔德反应、复分解反应、金属介导的交叉偶合反应、自由基聚合、氧化偶合、酰基转移反应、光点击反应、酶介导的反应、转谷氨酰胺酶介导的反应。

[0333] 本文所公开的开关可以包含有包含FITC或其衍生物的CAR-ID。产生这类开关的方法可以包括使连接子或其前体、包含TID的开关中间物(例如,TID开关中间物)或TID偶合至CAR-ID。使连接子或其前体、TID开关中间物偶合至CAR-ID可以包括FITC的异硫氰酸酯偶联至连接子或其前体、TID开关中间物或TID。TID可以基于或来源于多肽。多肽可以是抗体或抗体片段。使TID偶合至CAR-ID可以包括使FITC的异硫氰酸酯偶联至TID的氨基酸。氨基酸可以是赖氨酸。这种方法可以包括使或多个CAR-ID偶合至TID。这种方法可以包括使来自两个或更多个CAR-ID的FITC偶联至TID的两个或更多个氨基酸。两个或更多个氨基酸可以是赖氨酸。

[0334] 产生本文所公开的开关可以包括酯偶合。酯偶合可以包括在CAR-ID与TID之间形成酰胺键。酯偶合可以包括在开关中间物与TID之间形成酰胺键。开关中间物可以包含附接至连接子的CAR-ID。酰胺键可以在开关中间物的连接子与TID之间形成。连接子可以是NHS酯连接子。酰胺键可以在开关中间物的连接子与TID的氨基酸之间形成。CAR-ID可以包含小分子。小分子可以是FITC。TID可以基于或来源于多肽。多肽可以是抗体或抗体片段。TID可以包含小分子。

[0335] 产生本文所公开的开关的方法可以包括:(a)获得包含以下的开关中间物:(i)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(ii)连接子;以及(b)使开关中间物与标靶相互作用域(TID)接触,从而产生开关。使开关中间物与TID接触可以包括进行酯偶合反应。连接子可

以包含NHS酯连接子。TID可以包含一个或多个氨基酸。进行酯偶合反应可以包括在开关中间物的NHS酯连接子与TID的一个或多个氨基酸之间形成酰胺键。这种方法可以进一步包括产生多个开关。多个开关的两个或更多个开关可以包含附接至TID的两个或更多个不同氨基酸的两个或更多个开关中间物。举例来说,第一开关中间物可以附接至第一TID的赖氨酸残基并且第二开关中间物可以附接至第二TID的甘氨酸残基。多个开关的两个或更多个开关可以包含附接至TID的相同氨基酸的两个或更多个开关中间物。举例来说,两个或更多个开关中间物可以附接至第一和第二TID的赖氨酸残基。多个开关的两个或更多个开关可以包含附接至位于TID中的两个或更多个不同位置处的相同氨基酸的两个或更多个开关中间物。举例来说,第一开关中间物可以附接至第一TID的赖氨酸10并且第二开关中间物可以附接至第二TID的赖氨酸45。多个开关的两个或更多个开关可以包含附接至位于TID中的相同位置处的相同氨基酸的两个或更多个开关中间物。举例来说,第一开关中间物可以附接至第一TID的赖氨酸10并且第二开关中间物可以附接至第二TID的赖氨酸10。

[0336] 产生本文所公开的开关的方法可以包括使用一个或多个非天然氨基酸。这种方法可以包括将一个或多个非天然氨基酸并入CAR-ID中。CAR-ID可以基于或来源于可以与效应细胞上的嵌合抗原受体相互作用的多肽。多肽可以是基于非抗体的多肽。一般来说,基于非抗体的多肽是不包含抗体或抗体片段的多肽。非天然氨基酸可以并入基于非抗体的多肽中。非天然氨基酸可以置换基于非抗体的多肽的氨基酸。替代地或另外,这种方法可以包括将一个或多个非天然氨基酸并入TID中。TID可以基于或来源于多肽。多肽可以是抗体。多肽可以是基于非抗体的多肽。非天然氨基酸可以并入多肽中。非天然氨基酸可以置换多肽的氨基酸。

[0337] 产生开关的方法可以进一步包括修饰CAR-ID基于或来源于的多肽中的一个或多个氨基酸残基。产生开关的方法可以包括修饰TID基于或来源于的多肽中的一个或多个氨基酸残基。修饰一个或多个氨基酸残基可以包括使编码多肽的核苷酸序列中的一个或多个核苷酸突变。使编码的核苷酸序列中的一个或多个核苷酸突变可以包括使编码氨基酸的密码子变成无义密码子。

[0338] 将一个或多个非天然氨基酸并入CAR-ID基于或来源于的多肽中可以包括修饰多肽中的一个或多个氨基酸残基以产生抗体或抗体片段中的一个或多个琥珀密码子。将一个或多个非天然氨基酸并入TID基于或来源于的多肽中可以包括修饰多肽中的一个或多个氨基酸残基以产生抗体或抗体片段中的一个或多个琥珀密码子。

[0339] 一个或多个非天然氨基酸可以响应琥珀密码子并入多肽中。一个或多个非天然氨基酸可以位点特异性地并入多肽中。

[0340] 将一个或多个非天然氨基酸并入CAR-ID和TID基于或来源于的多肽中可以包括使用相对于典型的二十个氨基酸具有正交化学反应性的一个或多个遗传编码的非天然氨基酸以位点特异性地修饰抗体、抗体片段或靶向肽。并入一个或多个非天然氨基酸可以包括使用一个或多个tRNA合成酶。tRNA合成酶可以是氨酰基tRNA合成酶。tRNA合成酶可以是突变体tRNA合成。并入一个或多个非天然氨基酸可以包括tRNA/tRNA合成酶对。tRNA/tRNA合成酶对可以包含tRNA/氨酰基-tRNA合成酶对。tRNA/tRNA合成酶对可以包含tRNA^{Tyr}/酪氨酰基-tRNA合成酶对。并入一个或多个非天然氨基酸可以包括使用演化的tRNA/氨酰基-tRNA合成酶对以响应一个或多个琥珀无义密码子将一个或多个非天然氨基酸位点特异性

地并入多肽中的规定位点处。

[0341] 并入非天然氨基酸的额外方法包括(但不限于)以下文献中所公开的方法: Chatterjee等(用于大肠杆菌中的单个和多个非天然氨基酸诱变的通用平台(A Versatile Platform for Single-and Multiple-Unnatural Amino Acid Mutagenesis in *Escherichia coli*),《生物化学(Biochemistry)》,2013)、Kazane等(《美国化学会志(J Am Chem Soc)》,135(1):340-6,2013)、Kim等(《美国化学会志(J Am Chem Soc)》,134(24):9918-21,2012)、Johnson等(《自然化学生物学(Nat Chem Biol)》,7(11):779-86,2011)以及Hutchins等(《分子生物学杂志(J Mol Biol)》,406(4):595-603,2011)。

[0342] 产生用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关的方法可以包括(a)获得包含非天然氨基酸的靶相互作用域(TID);以及(b)使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)附接至TID,从而产生开关。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯肿酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生物。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。开关可以进一步包含连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以在一端处包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。连接子可以是NHS酯连接子。

[0343] 使CAR-ID附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使CAR-ID附接至TID可以包括无铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括使CAR-ID附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID中的预定位点。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。

[0344] 这种方法可以进一步包括使第一连接子附接至TID以产生第一开关中间物。使第一连接子附接至TID可以包括一个或环加成。使第一连接子附接至TID可以包括无铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第一连接子附接至TID可以包括肟接合。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个肟。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个稳定的键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个非共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个离子键。使第一连接子附接至TID可以包括使连接子附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0345] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至CAR-ID。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0346] 这种方法可以进一步包括使第二连接子附接至CAR-ID以产生第二开关中间物。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括肟接合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个肟。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个稳定的键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个非共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个离子键。

[0347] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第二开关中间物附接至TID。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第二开关中间物附接至TID可以包括无铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第二开关

中间物附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括使连接子附接至CAR-ID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0348] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至第二开关中间物。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0349] 产生用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关的方法可以包括(a)使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与标靶相互作用域(TID)接触;以及(b)通过使CAR-ID附接至TID上的预定位点来产生开关。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自由DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯肿酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生物。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。开关可以进一步包含连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以在一端处包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。连接子可以是NHS酯连接子。

[0350] 使CAR-ID附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使CAR-ID附接至TID可以包括无铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括一个

或多个异硫氰酸酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括使CAR-ID附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID中的预定位点。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。

[0351] 这种方法可以进一步包括使第一连接子附接至TID以产生第一开关中间物。使第一连接子附接至TID可以包括一个或环加成。使第一连接子附接至TID可以包括无铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第一连接子附接至TID可以包括肟接合。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个肟。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个稳定的键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个非共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个离子键。使第一连接子附接至TID可以包括使连接子附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0352] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至CAR-ID。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0353] 这种方法可以进一步包括使第二连接子附接至CAR-ID以产生第二开关中间物。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括肟接合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个肟。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个稳定的键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个非共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个离子键。

[0354] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第二开关中间物附接至TID。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或

多个环加成可以包括无铜环加成。使第二开关中间物附接至TID可以包括无铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括使连接子附接至CAR-ID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0355] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至第二开关中间物。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0356] 产生用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关的方法可以包括(a)使多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与多个靶相互作用域(TID)接触;以及(b)使多个CAR-ID的一个或多个CAR-ID附接至多个TID的一个或多个TID,从而产生多个开关,其中至少约60%的开关是结构上同源的。至少约65%、70%、72%、75%、77%、80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或100%的开关可以是结构上同源的。至少约70%的开关可以是结构上同源的。至少约75%的开关可以是结构上同源的。至少约80%的开关可以是结构上同源的。至少约85%的开关可以是结构上同源的。至少约90%的开关可以是结构上同源的。至少约95%的开关可以是结构上同源的。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯膦酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生物。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。开关可以进一步包含连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-

PEG-氨基连接子。连接子可以在一端处包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。连接子可以是NHS酯连接子。

[0357] 使CAR-ID附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使CAR-ID附接至TID可以包括无铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括使CAR-ID附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID中的预定位点。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。

[0358] 这种方法可以进一步包括使第一连接子附接至TID以产生第一开关中间物。使第一连接子附接至TID可以包括一个或环加成。使第一连接子附接至TID可以包括无铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第一连接子附接至TID可以包括肟接合。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个肟。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个稳定的键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个非共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个离子键。使第一连接子附接至TID可以包括使连接子附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0359] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至CAR-ID。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0360] 这种方法可以进一步包括使第二连接子附接至CAR-ID以产生第二开关中间物。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。

使第二连接子附接至CAR-ID可以包括肟接合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个肟。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个稳定的键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个非共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个离子键。

[0361] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第二开关中间物附接至TID。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第二开关中间物附接至TID可以包括无铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括使连接子附接至CAR-ID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0362] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至第二开关中间物。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0363] 产生用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关的方法可以包括(a)使多个嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与多个靶靶相互作用域(TID)接触;以及(b)使多个CAR-ID的CAR-ID附接至多个TID的TID,从而产生多个开关,其中CAR-ID附接至至少约60%的开关中的TID的相同氨基酸残基。CAR-ID可以附接至至少约62%、65%、67%、70%、72%、75%、77%、80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%、99%或100%的开关中的TID的相同氨基酸残基。CAR-ID可以附接至至少约70%的开关中的TID的相同氨基酸残基。CAR-ID可以附接至至少约75%的开关中的TID的相同氨基酸残基。CAR-ID可以附接至至少约80%的开关中的TID的相同氨基酸残基。CAR-ID可以附接至至少约85%的开关中的TID的相同氨基酸残基。CAR-ID可以附接至至少约90%的开关中的TID的相同氨基酸残基。

[0364] CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯膦酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生

物。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。开关可以进一步包含连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨氧基。连接子可以是叠氮-PEG-氨氧基连接子。连接子可以在一端处包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。连接子可以是NHS酯连接子。

[0365] 使CAR-ID附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使CAR-ID附接至TID可以包括无铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括使CAR-ID附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID中的预定位点。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。

[0366] 这种方法可以进一步包括使第一连接子附接至TID以产生第一开关中间物。使第一连接子附接至TID可以包括一个或环加成。使第一连接子附接至TID可以包括无铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第一连接子附接至TID可以包括肟接合。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个肟。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个稳定的键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个非共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个离子键。使第一连接子附接至TID可以包括使连接子附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0367] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至CAR-ID。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加

成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0368] 这种方法可以进一步包括使第二连接子附接至CAR-ID以产生第二开关中间物。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括肟接合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个肟。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个稳定的键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个非共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个离子键。

[0369] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第二开关中间物附接至TID。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第二开关中间物附接至TID可以包括无铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括使连接子附接至CAR-ID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0370] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至第二开关中间物。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0371] 产生用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关的方法可以包括(a)使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与靶靶相互作用域(TID)接触;以及(b)通过肟偶联、胡伊斯根环加成或狄尔斯-阿尔德反应使CAR-ID附接至TID,从而产生开关。CAR-ID可以包含小分

子。CAR-ID可以选自由DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯肿酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生物。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。开关可以进一步包含连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以在一端处包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。连接子可以是NHS酯连接子。

[0372] 使CAR-ID附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使CAR-ID附接至TID可以包括无铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使CAR-ID附接至TID可以包括使CAR-ID附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID中的预定位点。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。

[0373] 这种方法可以进一步包括使第一连接子附接至TID以产生第一开关中间物。使第一连接子附接至TID可以包括一个或环加成。使第一连接子附接至TID可以包括无铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第一连接子附接至TID可以包括肟接合。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个肟。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个稳定的键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个非共价键。使第一连接子附接至TID可以包括在第一连接子与TID之间形成一个或多个离子键。使第一连接子附接至TID可以包括使连接子附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第一

连接子附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0374] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至CAR-ID。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物附接至CAR-ID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0375] 这种方法可以进一步包括使第二连接子附接至CAR-ID以产生第二开关中间物。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括肟接合。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个肟。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个稳定的键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个非共价键。使第二连接子附接至CAR-ID可以包括在第二连接子与CAR-ID之间形成一个或多个离子键。

[0376] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第二开关中间物附接至TID。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第二开关中间物附接至TID可以包括无铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使第二开关中间物附接至TID可以包括使连接子附接至CAR-ID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第二开关中间物附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0377] 使CAR-ID附接至TID可以包括使第一开关中间物附接至第二开关中间物。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括无铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个含铜反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个酯偶合。使第一

开关中间物附接至第二开关中间物可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。

[0378] 产生用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关中间物的方法可以包括(b)使靶相互作用域(TID)与连接子接触,这个连接子在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基和/或环辛炔基;以及(c)使连接子附接至TID。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。使连接子附接至TID可以包括形成脒。脒可以在TID上的氨基酸的酮与连接子上的氨基之间形成。脒可以在连接子的烷氧基-胺基与非天然氨基酸的酮之间形成。脒可以在连接子的烷氧基-胺基与非天然氨基酸的酮之间形成,其中非天然氨基酸是对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基、环辛炔基或其组合。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑或1,2,4-三唑。连接子可以是NHS酯连接子。连接子可以是TriA连接子。连接子可以是NHS酯连接子。

[0379] 使连接子附接至TID可以包括一个或环加成。使连接子附接至TID可以包括无铜反应。使连接子附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使连接子附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使连接子附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使连接子附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使连接子附接至TID可以包括脒接合。使连接子附接至TID可以包括在连接子与TID之间形成一个或多个脒。使连接子附接至TID可以包括在连接子与TID之间形成一个或多个稳定的键。使连接子附接至TID可以包括在连接子与TID之间形成一个或多个共价键。使连接子附接至TID可以包括在连接子与TID之间形成一个或多个非共价键。使连接子附接至TID可以包括在连接子与TID之间形成一个或多个离子键。使连接子附接至TID可以包括使连接子附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使连接子附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0380] 产生用于活化嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的开关中间物的方法可以包括(a)使嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)与连接子接触,这个连接子在一个或多个末端处包含氨基、叠氮基和/或环辛炔基;以及(b)使连接子附接至CAR-ID。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯膦酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以是同双功能连接子。连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。连

接子可以包含至少四个PEG亚单元。连接子可以包含至少10个PEG亚单元。连接子可以包含至少20个PEG亚单元。连接子可以包含至少30个PEG亚单元。连接子可以在一端处包含叠氮。连接子可以在一端处包含氨基。连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。连接子可以在一端处包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以通过脰接合附接至CAR-ID。

[0381] 使连接子附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。使连接子附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使连接子附接至CAR-ID可以包括脰接合。使连接子附接至CAR-ID可以包括在连接子与CAR-ID之间形成一个或多个脰。使连接子附接至CAR-ID可以包括在连接子与CAR-ID之间形成一个或多个稳定的键。使连接子附接至CAR-ID可以包括在连接子与CAR-ID之间形成一个或多个共价键。使连接子附接至CAR-ID可以包括在连接子与CAR-ID之间形成一个或多个非共价键。使连接子附接至CAR-ID可以包括在连接子与CAR-ID之间形成一个或多个离子键。使连接子附接至CAR-ID可以包括使连接子附接至CAR-ID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0382] 产生式IV:X-L1-L2-Y或式IVA:Y-L2-L1-X的开关的方法可以包括(a)使L1偶合至X以产生式IIA:L1-X的第一开关中间物,其中(i)X包含与效应细胞上的嵌合抗原受体相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID),并且(ii)L1在偶合至X之前包含第一连接子;(b)使L2偶合至Y以产生式VA:Y-L2的第二开关中间物,其中(i)Y包含与靶细胞上的表面分子相互作用的靶相互作用域(TID),并且(ii)L2在偶合至X之前包含第二连接子;以及(c)使第一开关中间物连接至第二开关中间物,从而产生式IV或IVA的开关。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以选自由DOTA、二硝基苯酚、醌、生物素、苯胺、阿特拉津、苯胺衍生物、邻氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、胍屈嗪、氟烷、地高辛、苯膦酸盐、乳糖、三硝基苯酚、生物素或其衍生物组成的群组。CAR-ID可以包含异硫氰酸荧光素(FITC)。CAR-ID可以包含生物素。CAR-ID可以包含二硝基苯酚。

[0383] 第一连接子可以是双功能连接子。第一连接子可以是异双功能连接子。第一连接子可以是同双功能连接子。第一连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。第一连接子可以包含至少四个PEG亚单元。第一连接子可以包含至少10个PEG亚单元。第一连接子可以包含至少20个PEG亚单元。第一连接子可以包含至少30个PEG亚单元。第一连接子可以在一端处包含叠氮。第一连接子可以在一端处包含氨基。第一连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。第一连接子可以在一端处包含环辛炔。第一连接子可以是PEG-环辛炔连接子。

[0384] TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐或其衍生物。TID可以包含基于或来源于抗体或抗体片段的多肽。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID

NO:18-56中的任一者的多肽。

[0385] 第二连接子可以是双功能连接子。第二连接子可以是异双功能连接子。第二连接子可以是同双功能连接子。第二连接子可以进一步包含一个或多个聚乙二醇亚单元。第二连接子可以包含至少四个PEG亚单元。第二连接子可以包含至少10个PEG亚单元。第二连接子可以包含至少20个PEG亚单元。第二连接子可以包含至少30个PEG亚单元。第二连接子可以在一端处包含叠氮。第二连接子可以在一端处包含氨基。第二连接子可以是叠氮-PEG-氨基连接子。第二连接子可以在一端处包含环辛炔。第二连接子可以是PEG-环辛炔连接子。

[0386] 这种方法可以进一步包括将一个或多个非天然氨基酸并入X中。使L1偶合至X可以包括使L1附接至X中的非天然氨基酸。使L1偶合至X可以包括位点特异性附接。使L1偶合至X可以包括使L1附接至预定位点中的X。使L1偶合至X可以包括肟接合。使L1偶合至X可以包括酯偶合。

[0387] 这种方法可以进一步包括将一个或多个非天然氨基酸并入Y中。使L2偶合至Y可以包括使L2附接至Y中的非天然氨基酸。使L2偶合至Y可以包括位点特异性附接。使L2偶合至Y可以包括使L2附接至预定位点中的Y。使L2偶合至Y可以包括肟接合。使L2偶合至Y可以包括酯偶合。

[0388] 使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括一个或环加成。一个或多个环加成可以包括胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]环加成。一个或多个环加成可以包括[3+2]胡伊斯根环加成。一个或多个环加成可以包括无铜环加成。使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括无铜反应。使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括一个或多个含铜反应。使CAR-ID附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括一个或多个酯偶合。使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括一个或多个异硫氰酸酯偶合。使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括使CAR-ID附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第一开关中间物偶合至第二开关中间物可以包括一个或多个生物正交反应。第一开关中间物可以按位点特异性方式附接至第二开关中间物。第一开关中间物可以附接至第二开关中间物中的预定位点。第一开关中间物可以按位点非依赖性方式附接至第二开关中间物。

[0389] 使第一连接子附接至CAR-ID可以包括一个或环加成。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括无铜反应。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个含铜反应。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括一个或多个酯偶合。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括肟接合。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括在第一连接子与CAR-ID之间形成一个或多个肟。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括在第一连接子与CAR-ID之间形成一个或多个稳定的键。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括在第一连接子与CAR-ID之间形成一个或多个共价键。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括在第一连接子与CAR-ID之间形成一个或多个非共价键。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括在第一连接子与CAR-ID之间形成一个或多个离子键。使第一连接子附接至CAR-ID可以包括使连接子附接至CAR-ID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第一连接子附接

至CAR-ID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0390] 使第二连接子附接至TID可以包括一个或环加成。使第二连接子附接至TID可以包括无铜反应。使第二连接子附接至TID可以包括一个或多个含铜反应。使第二连接子附接至TID可以包括一个或多个狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至TID可以包括一个或多个杂狄尔斯-阿尔德反应。使第二连接子附接至TID可以包括一个或多个酯偶合。使第二连接子附接至TID可以包括肟接合。使第二连接子附接至TID可以包括在第二连接子与TID之间形成一个或多个肟。使第二连接子附接至TID可以包括在第二连接子与TID之间形成一个或多个稳定的键。使第二连接子附接至TID可以包括在第二连接子与TID之间形成一个或多个共价键。使第二连接子附接至TID可以包括在第二连接子与TID之间形成一个或多个非共价键。使第二连接子附接至TID可以包括在第二连接子与TID之间形成一个或多个离子键。使第二连接子附接至TID可以包括使连接子附接至TID的氨基酸。氨基酸可以是非天然氨基酸。使第二连接子附接至TID可以包括一个或多个生物正交反应。

[0391] 产生本文所公开的开关的方法可以进一步包括纯化开关。这种方法可以进一步包括纯化TID、CAR-ID、连接子或其任何组合。这些方法可以进一步包括纯化一个或多个开关中间物。TID可以包含多肽。多肽可以包含抗体或抗体片段。开关中间物可以包含TID和连接子。纯化开关和开关中间物可以包括去除过量连接子、过量TID以及过量CAR-ID。过量连接子、TID以及CAR-ID可以同时去除。过量连接子、TID以及CAR-ID可以依序去除。包含多肽的TID和CAR-ID的去除可以包括用一种或多种蛋白酶处理包含开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID的溶液。纯化开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID可以包括柱纯化。纯化开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID可以包括使用一个或多个浓缩柱、电泳、过滤、离心、色谱法或其组合。色谱法可以包括尺寸排阻色谱法。额外的色谱方法包括(但不限于)疏水相互作用色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法、金属结合、免疫亲和色谱法以及高效液相色谱法或高压液相色谱法。电泳可以包括变性电泳或非变性电泳。

[0392] 开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID可以包含一种或多种纯化标签或纯化分子。连接子可以包含一种或多种标签。标签可以用于纯化开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID。标签的实例包括(但不限于)聚组氨酸、FLAG®标签、HA、c-myc、V5、甲壳质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)以及谷胱甘肽-S-转移酶(GST)。标签可以是非肽标签。标签可以是生物素。一种或多种标签可以由一种或多种蛋白酶裂解。

[0393] 这些方法可以进一步包括CAR-BP、CAR-ID、CAR-ID、TC、TID以及其中间物的冻干或超速离心。

[0394] 开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID的纯度可以等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID的纯度可以等于或大于85%。开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID的纯度可以等于或大于90%。开关、开关中间物、连接子、CAR-ID和/或TID的纯度可以等于或大于95%。CAR-BP、CAR-ID、CAR-ID、TC、TID以及其中间物的纯度可以等于或大于97%。

[0395] 本文所公开的开关或开关中间物的均质度可以等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。开关或开关中间物的均质度可以等于或大于85%。开关或开关中间物的均质度可以

等于或大于90%。开关或开关中间物的均质度可以等于或大于95%。开关或开关中间物的均质度可以等于或大于97%。均质度可以指结构均质度。均质度可以是在将细胞施用于受试者之前的结构均质度。均质度可以是在通过细胞活动(甲基化、乙酰化、糖基化等等)修饰成CAR-EC开关之前的结构均质度。均质度的这些高百分比可以提供CAR-EC开关的更加可预测的效应。均质度的这些高百分比可以提供当与CAR-EC组合治疗受试者的病状时CAR-EC开关的更少脱靶效应。

[0396] 产生本文所公开的CAR-EC开关的方法可以包括产生具有等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的纯度的多个开关。多个开关的纯度可以等于或大于85%。多个开关的纯度可以等于或大于90%。多个开关可以等于或大于95%。多个开关的纯度可以等于或大于97%。纯度可以通过本领域中已知的方法(例如,颜色、水含量、热原质含量、杂质含量等等)来评估。通过肟偶联、胡伊斯根环加成或狄尔斯-阿尔德反应产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含多肽的TID的多个CAR-EC开关的纯度可以大于70%、75%、80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%或99%。通过肟偶联、胡伊斯根环加成或狄尔斯-阿尔德反应产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含多肽的TID的多个CAR-EC开关的纯度可以大于85%。通过肟偶联、胡伊斯根环加成或狄尔斯-阿尔德反应产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含多肽的TID的多个CAR-EC开关的纯度可以大于90%。通过肟偶联、胡伊斯根环加成或狄尔斯-阿尔德反应产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含多肽的TID的多个CAR-EC开关的纯度可以大于95%。通过化学合成产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含小分子的TID的多个开关的纯度可以是大于70%、75%、80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%或99%的纯度。通过化学合成产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含小分子的TID的多个开关的纯度可以是大于80%的纯度。通过化学合成产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含小分子的TID的多个开关的纯度可以是大于85%的纯度。通过化学合成产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含小分子的TID的多个开关的纯度可以是大于90%的纯度。通过化学合成产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含小分子的TID的多个开关的纯度可以是大于95%的纯度。通过化学合成产生的包含有包含FITC的CAR-ID和包含小分子的TID的多个开关的纯度可以是大于98%的纯度。

[0397] 嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)

[0398] 本文所公开的方法、平台以及试剂盒可以包含一个或多个嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)或其用途。方法、平台或试剂盒包括两个或更多个CAR-EC或其用途。方法、平台或试剂盒可以包含多个CAR-EC或其用途。多个CAR-EC中的至少两者可以属于相同细胞类型。多个CAR-EC中的至少两者可以属于相同细胞谱系。多个CAR-EC中的至少两者可以属于不同细胞类型。多个CAR-EC中的至少两者可以属于不同细胞谱系。多个CAR-EC中的至少两者可以包含相同的CAR。多个CAR-EC中的至少两者可以包含两个或更多个不同的CAR。多个CAR-EC中的至少两者可以包含两个或更多个相似的CAR。

[0399] CAR-EC可以包含表达CAR的效应细胞。效应细胞可以是T细胞。效应细胞可以是T细胞谱系的细胞。效应细胞可以是成熟T细胞。效应细胞可以是前体T细胞。效应细胞可以是细胞毒性T细胞。效应细胞可以是初始T细胞。效应细胞可以是记忆性干细胞T细胞(T_{MSC})。效应细胞可以是中枢记忆性T细胞(T_{CM})。效应细胞可以是效应T细胞(TE)。效应细胞可以是CD4+T

细胞。T细胞可以是CD8⁺T细胞。效应细胞可以是CD4⁺和CD8⁺细胞。效应细胞可以是 α BT细胞。效应细胞可以是 γ δ T细胞。效应细胞可以是自然杀伤T细胞。效应细胞可以是辅助T细胞。T细胞可以过度表达FoxP3。

[0400] 效应细胞可以是当接近靶或靶细胞时对标靶或靶细胞具有作用的效应细胞。效应细胞可以是当接近靶或靶细胞时对标靶或靶细胞具有细胞毒性作用的细胞。效应细胞可以是免疫细胞。效应细胞可以选自B细胞、单核细胞、凝血细胞、白细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、巨噬细胞或淋巴细胞。效应细胞可以是淋巴细胞。效应细胞可以是巨噬细胞。效应细胞可以是吞噬细胞。效应细胞可以是效应B细胞。效应细胞可以是自然杀伤细胞。效应细胞可以是来源于将要用本文所公开的CAR-EC开关或开关中间物治疗的受试者的细胞。

[0401] CAR-EC可以包含一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸。CAR-EC可以包含与一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%一致的聚核苷酸。CAR-EC可以包含与一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸至少约70%一致的聚核苷酸。CAR-EC可以表达由一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸编码的多肽。CAR-EC可以表达由与一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%一致的聚核苷酸编码的多肽。聚核苷酸可以组成性地表达。聚核苷酸可以条件性地表达。举例来说,为了活化CAR-EC中聚核苷酸的表达,将药物施用于CAR-EC。或者,为了终止CAR-EC中聚核苷酸的表达,将药物施用于CAR-EC。

[0402] 本文公开了产生一个或多个CAR-EC的方法。这种方法可以包括(a)用包含一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸的一个或多个病毒感染效应细胞;以及(b)在培养基中培养效应细胞,从而产生CAR-EC。这种方法可以进一步包括将一种或多种试剂施用于培养基以刺激聚核苷酸的表达。这种方法可以进一步包括将一种或多种试剂施用于培养基以富集CAR-EC。举例来说,聚核苷酸可以进一步包含药物可选择标志物,其可以用于富集已经受病毒感染的效应细胞。这种方法可以进一步包括纯化CAR-EC。纯化CAR-EC可以包括使用细胞分选器。举例来说,聚核苷酸可以进一步包含可检测标志物(例如,荧光蛋白),其可以用于纯化已经受病毒感染的效应细胞。纯化CAR-EC可以包括阳性选择。举例来说,可以使包含效应细胞和CAR-EC的混合物通过包含可以与CAR-EC的CAR相互作用的分子的柱。因此,CAR-EC可以被柱结合并且尚未成功感染的效应细胞释放于洗脱液中。可以将柱洗涤几次。可以从柱洗脱CAR-EC。纯化CAR-EC可以包括阴性选择。举例来说,感染的效应细胞中CAR的表达可以使得表面分子下调。可以使包含效应细胞和CAR-EC的混合物通过包含可以与下调的表面分子相互作用的分子的柱。因此,尚未受感染的效应细胞可以被柱结合并且表达CAR的效应细胞释放于洗脱液中。病毒可以是慢病毒。病毒可以是腺病毒。病毒可以是逆转录病毒。病毒可以是腺相关病毒。病毒可以是自身互补型腺相关病毒(scAAV)。病毒可以是修饰的人类免疫缺陷(HIV)病毒。病毒可以是修饰的单纯疱疹病毒(HSV)病毒。

[0403] 产生CAR-EC的方法可以包括(a)用包含一个或多个选自SEQ ID NO:1-4的聚核苷酸的一个或多个载体转染效应细胞;以及(b)在培养基中培养效应细胞,从而产生CAR-EC。这种方法可以进一步包括将一种或多种试剂施用于培养基以刺激聚核苷酸的表达。这种方

法可以进一步包括将一种或多种试剂施用于培养基以富集CAR-EC。举例来说,聚核苷酸可以进一步包含药物可选择标志物,其可以用于富集已经转染的效应细胞。这种方法可以进一步包括纯化CAR-EC。纯化CAR-EC可以包括使用细胞分选器。举例来说,聚核苷酸可以进一步包含可检测标志物(例如,荧光蛋白),其可以用于纯化已经转染的效应细胞。纯化CAR-EC可以包括阳性选择。举例来说,可以使包含效应细胞和CAR-EC的混合物通过包含可以与CAR-EC的CAR相互作用的分子的柱。因此,CAR-EC可以被柱结合并且尚未成功转染的效应细胞释放于洗脱液中。可以将柱洗涤几次。可以从柱洗脱CAR-EC。纯化CAR-EC可以包括阴性选择。举例来说,转染的效应细胞中CAR的表达可以使得表面分子下调。可以使包含效应细胞和CAR-EC的混合物通过包含可以与下调的表面分子相互作用的分子的柱。因此,尚未转染的效应细胞可以被柱结合并且表达CAR的效应细胞释放于洗脱液中。

[0404] 嵌合抗原受体(CAR)

[0405] 本文所公开的开关可以与CAR-EC上的嵌合抗原受体(CAR)相互作用,从而调控CAR-EC的活性。一般来说,CAR-ID与CAR的相互作用可以使得免疫反应被细胞活化。CAR可以包含胞外域、跨膜域以及胞内域。胞外域可以与CAR-EC开关的CAR-ID相互作用。胞外域可以包含抗体的至少一部分。在一些情况下,抗体不是全长抗体。胞外域可以包含免疫球蛋白或其片段的至少一部分。免疫球蛋白或其片段可以选自由IgA1、IgA2、IgD、IgM、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、scFv、二-scFv、双-scFv和Fab、Fc、F(ab')₂、pFc'、纳米抗体、亲和体、DARPin、双链抗体、骆驼抗体、工程改造的T细胞受体、或单抗体(monobody)组成的群组。免疫球蛋白可以包含IgG4。

[0406] 抗体可以具有约0.01pM、约0.02pM、约0.03pM、约0.04pM、0.05pM、约0.06pM、约0.07pM、约0.08pM、约0.09pM、约0.1pM、约0.2pM、0.3pM、约0.4pM、约0.5pM、约0.6pM、约0.7pM、约0.8pM、约0.9pM或约1pM、约2pM、约3pM、约4pM、约5pM、约6pM、约7pM、约8pM、约9pM、约10pM、约0.01nM、约0.02nM、约0.03nM、约0.04nM、约0.05nM、约0.06nM、约0.07nM、约0.08nM、约0.09nM、约0.1nM、约0.2nM、约0.3nM、约0.4nM、约0.5nM、约0.6nM、约0.7nM、约0.8nM、约0.9nM、约1nM、约2nM、约3nM、约4nM、约5nM、约6nM、约7nM、约8nM、约9nM、约10nM、约12nM、约14nM、约16nM、约18nM、约20nM、约22nM、约24nM、约26nM、约28nM或约30nM的结合亲和力和。胞外域可以包含单链可变片段(scFv)的至少一部分。胞外域可以包含抗生物素蛋白或其片段。胞外域可以不包含抗生物素蛋白或其片段。抗体可以包含抗FITC抗体或其片段。抗FITC抗体可以是抗FITC scFv。抗FITC scFv可以选自4-4-20、4D5Flu、4M5.3以及FITC-E2。抗FITC scFv可以由选自SEQ ID NO:1-4的序列编码。

[0407] 针对FITC的抗体或其片段可以具有小于0.1pM的对FITC的结合亲和力。针对FITC的抗体或其片段可以具有介于约0.1pM与约1pM之间的对FITC的结合亲和力。针对FITC的抗体或其片段可以具有介于约1pM与约10pM之间的对FITC的结合亲和力。针对FITC的抗体或其片段可以具有约10pM、约20pM、约30pM、约40pM、约50pM、约60pM、约70pM、约80pM、约90pM或约100pM的对FITC的结合亲和力。针对FITC的抗体或其片段可以具有约100pM、约200pM、约300pM、约400pM、约500pM、约600pM、约700pM、约800pM、约900pM或约1nM的对FITC的结合亲和力。针对FITC的抗体或其片段可以具有约1nM、约2nM、约3nM、约4nM、约5nM、约6nM、约7nM、约8nM、约9nM或约10nM的对FITC的结合亲和力。针对FITC的抗体或其片段可以具有约10nM、约15nM、约20nM、约25nM、约30nM、约35nM、约40nM、约45nM或约50nM的对FITC的结合亲

和力。针对FITC的抗体或其片段可以具有大于50nM的对FITC的结合亲和力。针对FITC的抗体可以包含抗FITC scFv或其片段。抗FITC scFv可以选自包含4-4-20、4D5Flu、4M5.3以及FITC-E2的群组。4-4-20的结合亲和力可以为约0.2nM。4D5Flu的结合亲和力可以为约20nM。4M5.3的结合亲和力可以为约0.3pM。FITC-E2的结合亲和力可以为约0.3nM。

[0408] 跨膜域和/或胞内域可以包含细胞质信号传导域的至少一部分。胞内域可以包含选自包含CD3 ξ 、CD28以及4-1BB的群组的信号传导分子的至少一部分。胞内域可以包含Fc受体或其一部分。Fc受体或其一部分可以是CD16或其一部分。信号传导分子可以包含CD3 ξ 。信号传导分子可以包含CD28。信号传导分子可以包含4-1BB。胞内域可以包含CD3 ξ 的至少一部分。胞内域可以包含CD28的至少一部分。胞内域可以包含4-1BB的至少一部分。胞内域可以包含OX-40的至少一部分。胞内域可以包含CD30的至少一部分。胞内域可以包含CD40的至少一部分。胞内域可以包含CD2的至少一部分。胞内域可以包含CD27的至少一部分。胞内域可以包含PD-1的至少一部分。胞内域可以包含ICOS的至少一部分。胞内域可以包含淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1)的至少一部分。胞内域可以包含CD7的至少一部分。胞内域可以包含LIGHT的至少一部分。胞内域可以包含NKG2C的至少一部分。胞内域可以包含B7-H3的至少一部分。胞内域可以包含来自一个或多个信号传导分子的细胞质信号传导域的至少一部分。胞内域可以包含两个或更多个细胞质信号传导域的至少一部分。两个或更多个细胞质信号传导域可以来自两个或更多个不同信号传导分子。胞内域可以包含三个或更多个细胞质信号传导域的至少一部分。胞内域可以包含四个或更多个细胞质信号传导域的至少一部分。胞内域可以包含结合至一个或多个信号传导分子的配体的至少一部分。胞内域可以包含结合至CD83的配体的至少一部分。

[0409] CAR-EC平台

[0410] 本文公开了嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)平台,其包含表达嵌合抗原受体(CAR)的效应细胞;以及本文所公开的嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)开关。CAR-EC开关可以是均质的。CAR-EC开关可以是结构上均质的。CAR-ID可以选自本文所公开的CAR结合小分子(CAR-ID)和CAR结合组分(CAR-ID)。TID可以选自本文所公开的靶标相互作用域和TID。

[0411] CAR-EC平台可以包含多个CAR-EC开关,其中CAR-EC开关中的至少一者公开于本文中。多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个CAR-EC开关。多个CAR-EC开关可以包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个CAR-EC开关。多个CAR-EC开关可以包含多于20个、多于25个、多于30个、多于35个、多于40个、多于45个或多于50个CAR-EC开关。两个或更多个CAR-EC开关可以选自本文所公开的一个或多个CAR-EC开关或其组合。

[0412] 本文所公开的抗体或肽可以包含一个或多个非天然氨基酸。TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。CAR-ID和TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。CAR-ID和TID可以由一个或多个非天然氨基酸连接。CAR-ID和TID可以由2个非天然氨基酸连接。CAR-ID和TID可以由3个非天然氨基酸连接。一个或多个非天然氨基酸可以置换TID的一个或多个氨基酸残基。一个或多个非天然氨基酸可以置换本文所公开的肽或抗体的任何氨基酸。

[0413] 本文所公开的CAR-EC平台可以进一步包含两个或更多个CAR-EC开关。两个或更多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个相同的CAR-ID。两个或更多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个不同的CAR-ID。两个或更多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个相似的CAR-

ID。两个或更多个CAR-ID可以包含相似的氨基酸序列。两个或更多个CAR-ID的氨基酸序列可以约99%、约98%、约97%、约96%、约95%、约92%、约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%或约2%一致。两个或更多个CAR-ID的氨基酸序列可以约75%一致。

[0414] 两个或更多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个不同的TID。两个或更多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个相同的TID。两个或更多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个相似的TID。两个或更多个TID可以包含相似的氨基酸序列。两个或更多个TID的氨基酸序列可以约99%、约98%、约97%、约96%、约95%、约92%、约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%或约2%一致。两个或更多个TID的氨基酸序列可以约75%一致。

[0415] CAR-EC标靶

[0416] 本文所公开的开关可以将一个或多个嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)引导至一个或多个标靶。一般来说, CAR-EC和标靶结合至CAR-EC开关使得标靶与CAR-EC接近, 这是足够靠近的以使CAR-EC的活性对标靶具有作用。举例来说, 当CAR-EC和标靶附接至CAR-EC开关时, CAR-EC可以释放结合至标靶上的细胞因子受体的细胞因子。本文所公开的开关可以将一个或多个嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)引导至两个或更多个标靶。本文所公开的开关可以将一个或多个嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)引导至三个或更多个标靶。本文所公开的开关可以将四个或更多个嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)引导至一个或多个标靶。本文所公开的开关可以将五个或更多个嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)引导至一个或多个标靶。本文所公开的开关可以将6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)引导至一个或多个标靶。两个或更多个标靶可以是相同的。两个或更多个标靶可以属于相同细胞类型。两个或更多个标靶可以属于相同细胞谱系。两个或更多个标靶可以是不同的。两个或更多个标靶可以属于不同细胞类型。两个或更多个标靶可以属于不同细胞谱系。三个或更多个标靶中的至少两者可以是相同的。三个或更多个标靶中的至少两者可以属于相同细胞类型。三个或更多个标靶中的至少两者可以属于相同细胞谱系。三个或更多个标靶中的至少两者可以是不同的。三个或更多个标靶中的至少两者可以属于不同细胞类型。三个或更多个标靶中的至少两者可以属于不同细胞谱系。

[0417] 标靶可以是细胞。标靶可以是细胞的片段。标靶可以是一个或多个细胞。标靶可以包含来自罹患疾病或病状的受试者的细胞。标靶可以包含感染的细胞。标靶可以包含病原感染的细胞。标靶可以包含患病的细胞。标靶可以是癌细胞。标靶可以是遗传修饰的细胞。标靶可以是一个或多个分裂细胞。标靶可以包含对受试者而言外来的细胞。标靶可以来自侵入的生物体(例如, 酵母、蠕虫、细菌、真菌)。标靶可以是病原体。标靶可以是细菌。标靶可以是病毒或其一部分。

[0418] 标靶可以选自干细胞、癌症干细胞、多能细胞、造血干细胞或内皮祖细胞。标靶可以来源于组织。组织可以选自脑、食道、乳房、结肠、肺、神经胶质、卵巢、子宫、睾丸、前列腺、胃肠道、膀胱、肝、胸腺、骨以及皮肤。标靶可以来源于一个或多个内分泌腺。替代地或另外, 标靶可以来源于一个或多个内分泌腺。内分泌腺可以是淋巴腺、垂体腺、甲状腺、甲状旁腺、胰腺、性腺或松果腺。

[0419] 标靶可以包含癌细胞。癌细胞可以来源于组织。组织可以选自脑、食道、乳房、结肠、肺、神经胶质、卵巢、子宫、睾丸、前列腺、胃肠道、膀胱、肝、胸腺以及皮肤。癌细胞可以来源于骨。癌细胞可以来源于血液。癌细胞可以来源于B细胞、T细胞、单核细胞、凝血细胞、白细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、造血干细胞或内皮祖细胞。癌细胞来源于CD19阳性B淋巴细胞。癌细胞可以来源于干细胞。癌细胞可以来源于多能细胞。癌细胞可以来源于一个或多个内分泌腺。内分泌腺可以是淋巴腺、垂体腺、甲状腺、甲状旁腺、胰腺、性腺或松果腺。

[0420] 标靶可以是CD19阳性细胞。标靶可以是CD19阳性B淋巴细胞。标靶可以是Her2阳性细胞。Her2阳性细胞可以是Her2阳性乳腺癌细胞。标靶可以是BCMA阳性细胞。标靶可以是BCMA阳性多发性骨髓瘤细胞。标靶可以是CS1阳性细胞。CS1阳性细胞可以是多发性骨髓瘤细胞。标靶可以是EGFRvIII阳性细胞。标靶可以是EGFRvIII阳性成胶质细胞瘤细胞。标靶可以是CD20阳性细胞。标靶可以是PSMA阳性细胞。标靶可以是PSMA阳性前列腺癌细胞。标靶可以是叶酸盐受体阳性细胞。标靶可以是叶酸盐受体阳性卵巢癌细胞。

[0421] CAR-EC标靶上的表面分子

[0422] 本文所公开的开关的标靶相互作用域(TID)可以结合至标靶上的分子或与标靶上的分子相互作用。TID可以结合标靶上的抗原、蛋白质、肽或生物分子。蛋白质可以是酶。酶可以具有酶促活性。经由非限制性实例,生物分子可以选自纤维、生物聚合物(例如,胶原蛋白)、聚糖、糖脂、蛋白聚糖、脂质、固醇、碳水化合物、核酸以及细胞片段。抗原可以是细胞上的表面抗原或细胞表面标志物的至少一部分。抗原可以是细胞上的受体或辅受体。

[0423] TID可以结合至标靶上的抗原。抗原可以是标靶上的表面抗原。抗原可以选自蛋白质、脂质、糖脂、碳水化合物、多糖、核酸或其组合。抗原可以包含细菌、病毒以及其它微生物的部分(例如,包衣、被膜、细胞壁、鞭毛、纤毛以及毒素)。抗原可以包含聚糖。抗原可以包含脂质。抗原可以包含糖脂。抗原可以包含碳水化合物。抗原可以包含蛋白质。抗原可以包含修饰。经由非限制性实例,修饰可以是磷酸化、乙酰化、豆蔻酰化、棕榈酰化或甲基化。抗原可以包含前列腺特异性膜抗原。

[0424] 抗原可以引发一个或多个抗体的产生。抗原可以指可以由主要组织相容性复合物(MHC)结合并且呈递至T细胞受体的分子或分子片段。术语“抗原”也可以指免疫原。免疫原如果单独注射至受试者中,可以激发适应性免疫反应。免疫原可以独立诱导免疫反应。抗原可以是超抗原、T依赖性抗原或T非依赖性抗原。

[0425] 抗原可以是外源性抗原或内源性抗原。外源性抗原通常是已经例如通过吸入、摄入或注射从外部进入体内的抗原。一些抗原可能开始是外源性抗原,并且稍后变成内源性的(例如,细胞内病毒)。细胞内抗原在感染的细胞破坏后可以再次释放回循环中。内源性抗原可以是已经在先前正常的细胞内作为正常细胞代谢的结果,或由于病毒或细胞内细菌性感染而产生的抗原。

[0426] 抗原还可以包括自体抗原。自体抗原可以由罹患特定自体免疫疾病的患者的免疫系统识别的正常蛋白质或蛋白质复合物(并且有时是DNA或RNA)。这些抗原在正常条件下不应是免疫系统的标靶,但主要归因于遗传和环境因素,对这种抗原的正常免疫耐受性在这些患者中已经失去。

[0427] 抗原可以包括肿瘤抗原。肿瘤抗原或新抗原可以由MHC I或MHC II分子呈递于

肿瘤细胞的表面上的抗原。这些抗原有时可以由肿瘤细胞呈递并且从不由正常细胞呈递。在这种情况下,这些抗原被称为肿瘤特异性抗原(TSA),并且一般由肿瘤特异性突变产生。更常见的是由肿瘤细胞和正常细胞呈递的抗原,并且其被称为肿瘤相关抗原(TAA)。识别这些抗原的细胞毒性T淋巴细胞可以能够破坏在增殖或转移之前的肿瘤细胞。肿瘤抗原还可以在肿瘤的表面上呈例如突变的受体形式,在这种情况下其可以由B细胞识别。

[0428] 抗原可以是受体。受体可以是细胞外受体。受体可以是细胞表面受体。受体可以结合激素、神经递质、细胞因子、生长因子或细胞识别分子。受体可以是跨膜受体。受体可以是酶联受体。

[0429] TID可以结合表面分子。经由非限制性实例,表面分子可以选自靶上的抗原、受体、辅受体、跨膜蛋白或细胞标志物。细胞表面蛋白可以选自胆囊收缩素B受体、促性腺激素释放激素受体、生长抑素受体2、avb3整合素、胃泌素释放肽受体、神经激肽1受体、黑皮质素1受体、神经降压素受体、神经肽Y受体以及C型凝集素样分子1。

[0430] TID可以结合与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约98%或约100%同源的靶。TID可以结合与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少约50%同源的靶。TID可以结合与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少约70%同源的靶。TID可以结合与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至少约85%同源的靶。TID可以包含前列腺特异性膜抗原(PSMA)配体、活化剂、结合分子或其衍生物。TID可以包含前列腺特异性膜抗原(PSMA)抑制剂或其衍生物。PSMA也可以称作谷氨酸羧肽酶II和N-乙酰基-L-天冬氨酰基-L-谷氨酸肽酶I。PSMA抑制剂可以是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。

[0431] TID可以结合与叶酸受体至少约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约98%或约100%同源的靶。TID可以结合与叶酸受体至少约50%同源的靶。TID可以结合与叶酸受体至少约70%同源的靶。TID可以结合与叶酸受体至少约85%同源的靶。TID可以选自叶酸受体配体、叶酸受体抑制剂、叶酸受体活化剂、叶酸受体结合分子或其衍生物。TID可以包含叶酸或其衍生物。TID可以基本上由叶酸或其衍生物组成。

[0432] 受体可以是G蛋白偶合受体(GPCR)。GPCR受体可以是GNRH受体、内皮素受体、平滑受体(Smoothed)、卷曲受体(Frizzled)、CXCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CCR7、CKK2受体、S1P受体、蛋白酶活化受体(PAR)或其一部分。受体可以是离子通道连接受体。离子通道连接受体可以是电压门控钾通道、电压门控钙通道、瞬时受体电位通道、梅拉斯达汀样(melastatin-like)瞬时受体电位通道(例如,TRPM1、TRPM7、TRPM8)、瓦林诺德(vallinoid)通道(例如,TRPV6)或上皮钠通道。

[0433] TID可以与靶上的受体相互作用。受体可以是生长因子受体。生长因子受体可以是表皮生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体、血小板源性生长因子受体、神经生长因子受体、转化生长因子受体、骨形态发生蛋白生长因子受体、肝细胞生长因子受体、血管内皮生长因子受体、干细胞因子受体、胰岛素生长因子受体、生长调节素受体或促红细胞生成素受体。受体可以是激素受体。受体可以是胰岛素受体。受体可以是类花生酸受体、前列腺素

受体、雌激素受体、促卵泡激素受体、孕酮受体、生长激素受体或促性腺激素释放激素受体。受体可以是肾上腺素能受体。受体可以是整合素。受体可以是Eph受体。

[0434] 受体可以是免疫受体。免疫受体可以是模式识别受体、钟样受体、NOD样受体、杀伤活化受体、杀伤抑制受体、Fc受体、B细胞受体、补体受体、趋化因子受体或细胞因子受体。细胞因子受体可以是白介素受体、干扰素受体、转化生长因子受体、肿瘤坏死因子受体或集落刺激因子受体。

[0435] 受体可以是受体激酶。受体激酶可以是酪氨酸激酶受体。受体激酶可以是丝氨酸激酶受体。受体激酶可以是苏氨酸激酶受体。受体激酶可以活化Ras、Raf、PI3K、PKA、PKC、AKT、AMPK或磷脂酶。受体激酶可以活化MAPK/ERK信号传导路径。受体激酶可以活化Jak、Stat或Smad。

[0436] TID可以与包含糖脂的表面分子相互作用。TID可以与包含碳水化合物的表面分子相互作用。TID可以与包含分化簇(CD)蛋白的表面分子相互作用。TID可以与选自CD34、CD31、CD117、CD45、CD11b、CD15、CD24、CD114、CD182、CD14、CD11a、CD91、CD16、CD3、CD4、CD25、Foxp3、CD8、CD38、CD61、CD56、CD30、CD13以及CD33组成的群组的表面分子相互作用。

[0437] 试剂盒、载体以及聚核苷酸

[0438] 本文公开了包含本文所公开的一个或多个CAR-EC开关的试剂盒。试剂盒可以进一步包含两个或更多个CAR-EC开关。试剂盒可以包含三个CAR-EC开关。试剂盒可以包含约3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、12个、15个、20个、24个、30个、35个、48个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、96个、100个、120个、150个、200个、300个、384个、400个、500个、600个、700个、800个、900个或1000个CAR-EC开关。包含两个或更多个CAR-EC开关的试剂盒可以包含两个或更多个相同的非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个不同的非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以包含两个或更多个相似的非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以在不同位点处包含两个或更多个非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以在连续位点处包含两个或更多个非天然氨基酸。试剂盒可以用于生物研究。试剂盒可以用于诊断疾病或病状。试剂盒可以用于治疗疾病或病状。试剂盒可以进一步包含一个或多个效应细胞。效应细胞可以是T细胞。效应细胞可以表达一个或多个CAR。试剂盒可以进一步包含编码CAR的抗体/肽的聚核苷酸。试剂盒可以进一步包含含有编码CAR的抗体/肽的聚核苷酸的载体。CAR可以选自本文所公开的CAR中的任一者。

[0439] 本文所公开的CAR-EC开关的抗体和/或肽可以由一个或多个选自SEQ ID NO:5-9的聚核苷酸编码。CAR或其部分可以由与一个或多个选自SEQ ID NO:5-9的聚核苷酸至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%一致的聚核苷酸编码。本文所公开的CAR-EC开关的抗体和/或肽可以由可以与一个或多个选自SEQ ID NO:5-9的聚核苷酸至少约70%一致的聚核苷酸编码。本文公开了包含一个或多个选自SEQ ID NO:5-9的聚核苷酸的载体。

[0440] 治疗用途

[0441] 嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)开关和开关中间物可以用于治疗有需要的受试者的疾病或病状。本文所公开的开关或开关中间物可以用于制造用以治疗疾病的药物。治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法可以包括将本文所公开的开关中的任一者施用于

受试者。开关可以包含嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)和靶相互作用域(TID)。开关可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。开关可以包含有包含小分子的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)。CAR-ID可以包含FITC。CAR-ID可以包含一个或多个非天然氨基酸。开关可以进一步包含一个或多个TID。开关可以包含有包含基于或来源于抗体的多肽的靶相互作用域(TID)。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。CAR-ID和TID可以按位点特异性方式衔接。CAR-ID位点特异性衔接至TID可以经由非天然氨基酸发生。CAR-ID和TID可以按位点非依赖性方式衔接。开关可以包含有包含小分子的TID。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐。开关可以进一步包含连接子。开关可以进一步包含一个或多个额外的连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。替代地或另外,这种方法可以进一步包括施用嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)。CAR-EC可以表达嵌合抗原受体(CAR)。CAR可以由SEQ ID NO:1-4中的任一者的核苷酸序列编码。CAR可以包含基于或来源于抗体的外域。CAR的外域可以基于或来源于抗FITC抗体。CAR的外域可以基于或来源于抗FITC scFv。开关和CAR-EC可以同时施用。开关和CAR-EC可以依序施用。

[0442] 治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法可以包括将一个或多个开关中间物施用于受试者。开关中间物可以包含CAR-ID和连接子,其中连接子包含反应性官能团。开关中间物可以包含TID和连接子。开关中间物可以包含TID和连接子,其中连接子包含反应性官能团。开关中间物可以包含有包含反应性官能团的CAR-ID。开关中间物可以包含有包含反应性官能团的TID。包含CAR-ID的第一开关中间物可以与包含TID的第二开关中间物组合。包含CAR-ID和连接子的第一开关中间物可以与包含TID的第二开关中间物组合。包含CAR-ID和第一连接子的第一开关中间物可以与包含TID和第二连接子的第二开关中间物组合。第一开关中间物可以包含第一反应性官能团。第二开关中间物可以包含第二反应性官能团。第一开关的第一反应性官能团和第二开关的第二反应性官能团可以彼此相互作用。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以包含FITC。CAR-ID可以包含一个或多个非天然氨基酸。TID可以包含基于或来源于抗体的多肽。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脒基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。

[0443] 这些方法可以包括施用一个或多个CAR-EC开关。这些方法可以包括施用约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、12个、15个、20个、24个、30个、35个、48个、50个、

55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、96个、100个、120个、150个、200个、300个、384个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个或更多个CAR-EC开关。这些方法可以包括施用两个或更多个CAR-EC开关。两个或更多个CAR-EC开关可以包含相同的CAR-ID。多于两个CAR-EC开关可以包含相同的TID。两个或更多个CAR-EC开关可以包含相同的连接子。两个或更多个CAR-EC开关可以包含一个或多个不同的CAR-ID。多于两个CAR-EC开关可以包含一个或多个不同的TID。两个或更多个CAR-EC开关可以包含一个或多个不同的连接子。两个或更多个CAR-EC开关可以包含一个或多个相同的非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以包含一个或多个不同的非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以包含一个或多个相似的非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以在相同位点处包含一个或多个非天然氨基酸。举例来说,第一CAR-EC开关的第一TID可以在位置309处包含非天然氨基酸并且第二CAR-EC开关的第二TID可以在位置309处包含非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以在不同位点处包含一个或多个非天然氨基酸。举例来说,第一CAR-EC开关的第一TID可以在位置110处包含非天然氨基酸并且第二CAR-EC开关的第二TID可以在位置205处包含非天然氨基酸。两个或更多个CAR-EC开关可以在连续位点处包含一个或多个非天然氨基酸。举例来说,第一CAR-EC开关的第一TID可以在位置202处包含非天然氨基酸并且第二CAR-EC开关的第二TID可以在位置203处包含非天然氨基酸。非天然氨基酸可以在TID内。非天然氨基酸可以在CAR-ID内。

[0444] 本文公开了治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法,这种方法包括将本文所公开的嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)开关施用于受试者,其中CAR-EC开关包含:结合CAR-EC上的嵌合抗原受体(CAR)的嵌合抗原受体结合小分子(CAR-ID);以及结合标靶上的表面分子并且包含非天然氨基酸的标靶相互作用域(TID)。CAR-ID和TID可以经由非天然氨基酸位点特异性地连接。经由非限制性实例,CAR-ID可以是FITC。经由非限制性实例,TID可以选自抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体。TID可以包含抗体片段。CAR-EC开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID连接至TID。连接子可以连接至TID内的非天然氨基酸。连接子可以通过肽接合附接至TID。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。替代地或另外,这种方法可以进一步包括施用嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)。CAR-EC可以表达嵌合抗原受体(CAR)。CAR可以由SEQ ID NO:1-4中的任一者的核苷酸序列编码。CAR可以包含基于或来源于抗体的外域。CAR的外域可以基于或来源于抗FITC抗体。CAR的外域可以基于或来源于抗FITC scFv。开关和CAR-EC可以同时施用。开关和CAR-EC可以依序施用。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是前列腺癌。癌症可以是乳癌。癌症可以是白血病。

[0445] 本文公开了治疗有需要的受试者的疾病或病状的方法,这种方法包括将嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)开关施用于受试者,其中CAR-EC开关包含:嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及标靶相互作用域(TID),其中CAR-ID和TID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸。CAR-ID可以是小分子。经由非限制性实例,CAR-ID可以是FITC。TID可以是小分子。TID可以是叶酸盐或其衍生物。TID可以与标靶上的与前列腺特异性膜抗原(PSMA)至

少50%同源的表面分子相互作用。TID可以是2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。CAR-EC开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID连接至TID。连接子可以连接至TID内的非天然氨基酸。连接子可以通过肽接合附接至TID。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。替代地或另外,这种方法可以进一步包括施用嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)。CAR-EC可以表达嵌合抗原受体(CAR)。CAR可以由SEQ ID NO:1-4中的任一者的核苷酸序列编码。CAR可以包含基于或来源于抗体的外域。CAR的外域可以基于或来源于抗FITC抗体。CAR的外域可以基于或来源于抗FITC scFv。开关和CAR-EC可以同时施用。开关和CAR-EC可以依序施用。疾病或病状可以是癌症。

[0446] 本文所公开的开关或开关中间物可以用于制造用以治疗疾病的药物。开关可以包含嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)和靶向相互作用域(TID)。开关可以进一步包含一个或多个连接子。开关可以进一步包含一个或多个额外的CAR-ID。开关可以进一步包含一个或多个TID。CAR-ID可以包含一个或多个非天然氨基酸。TID可以包含一个或多个非天然氨基酸。CAR-ID和TID可以按位点特异性方式附接。CAR-ID位点特异性附接至TID可以经由非天然氨基酸发生。CAR-ID和TID可以按位点非依赖性方式附接。开关中间物可以包含CAR-ID和连接子。开关中间物可以包含CAR-ID和连接子,其中连接子包含反应性官能团。开关中间物可以包含TID和连接子。开关中间物可以包含TID和连接子,其中连接子包含反应性官能团。开关中间物可以包含有包含反应性官能团的CAR-ID。开关中间物可以包含有包含反应性官能团的TID。包含CAR-ID的第一开关中间物可以与包含TID的第二开关中间物组合。包含CAR-ID和连接子的第一开关中间物可以与包含TID的第二开关中间物组合。包含CAR-ID的第一开关中间物可以与包含TID和连接子的第二开关中间物组合。包含CAR-ID和第一连接子的第一开关中间物可以与包含TID和第二连接子的第二开关中间物组合。第一开关中间物可以包含第一反应性官能团。第二开关中间物可以包含第二反应性官能团。第一开关的第一反应性官能团和第二开关的第二反应性官能团可以彼此相互作用。

[0447] 本文公开了开关的用途,这种开关包含与效应细胞上的嵌合抗原受体(CAR)相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及包含非天然氨基酸的靶靶相互作用域(TID),其中TID与靶靶上的表面分子相互作用,以治疗有需要的受试者的疾病或病状。CAR-ID和TID可以附接。CAR-ID和TID可以按位点特异性方式附接。CAR-ID位点特异性附接至TID可以包括使CAR-ID附接至TID中的非天然氨基酸。开关可以进一步包含连接子。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以包含FITC。CAR-ID可以包含一个或多个非天然氨基酸。TID可以包含基于或来源于抗体的多肽。抗体可以选自抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接

子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。疾病可以是癌症。癌症可以是前列腺癌。癌症可以是乳癌。癌症可以是白血病。

[0448] 本文公开了开关的用途,这种开关包含与效应细胞上的嵌合抗原受体(CAR)相互作用的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及包含非天然氨基酸的靶标相互作用域(TID),其中TID与靶标上的表面分子相互作用,以制造用以治疗疾病的药物。CAR-ID和TID可以附接。CAR-ID和TID可以按位点特异性方式附接。CAR-ID位点特异性附接至TID可以包括使CAR-ID附接至TID中的非天然氨基酸。开关可以进一步包含连接子。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以包含FITC。CAR-ID可以包含一个或多个非天然氨基酸。TID可以包含基于或来源于抗体的多肽。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。抗体可以是抗EGFR抗体。抗体可以是抗CD20抗体。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。抗体可以包含SEQ ID NO:10-17中的任一者的氨基酸序列。抗体可以由SEQ ID NO:5-9中的任一者的核苷酸序列编码。TID可以包含基于或来源于SEQ ID NO:18-56中的任一者的多肽。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。疾病可以是癌症。癌症可以是前列腺癌。癌症可以是乳癌。癌症可以是白血病。

[0449] 本文进一步公开了开关的用途,这种开关包含(a)包含FITC或其衍生物的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)与靶标上的表面分子相互作用的靶标相互作用域(TID),用于治疗受试者的疾病或病状。TID可以包含多肽。多肽可以基于或来源于抗体或抗体片段。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CD19抗体。TID可以包含抗体片段。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以经由非天然氨基酸位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。TID可以包含与靶标上的表面分子相互作用。表面分子可以是CD19。CD19可以在B细胞上。CD19可以在浆细胞上。CD19可以在浆B细胞上。CD19可以在原生质细胞上。CD19可以在效应B细胞上。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是多发性骨髓瘤。

[0450] 本文进一步公开了开关的用途,这种开关包含(a)包含FITC或其衍生物的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)与靶标上的表面分子相互作用的靶标相互作用域

(TID), 用于治疗受试者的疾病或病状。TID可以包含多肽。多肽可以基于或来源于抗体或抗体片段。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗HER2抗体。TID可以包含抗体片段。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以经由非天然氨基酸位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。TID可以包含与标靶上的表面分子相互作用。表面分子可以是Her2。Her2可以在癌细胞上。Her2可以在乳腺癌细胞上。Her2可以在起源于乳房组织的细胞上。标靶可以是表达Her2的细胞。标靶可以是过度表达Her2的细胞。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是乳腺癌。

[0451] 本文进一步公开了开关的用途, 这种开关包含(a)包含FITC或其衍生物的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID); 以及(b)与标靶上的表面分子相互作用的标靶相互作用域(TID), 用于治疗受试者的疾病或病状。TID可以包含多肽。多肽可以基于或来源于抗体或抗体片段。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗CS1抗体。TID可以包含抗体片段。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以经由非天然氨基酸位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。TID可以包含与标靶上的表面分子相互作用。表面分子可以是CS1。CS1可以在B细胞上。CS1可以在浆细胞上。CS1可以在浆B细胞上。CS1可以在原生质细胞上。CS1可以在效应B细胞上。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是多发性骨髓瘤。

[0452] 本文进一步公开了开关的用途, 这种开关包含(a)包含FITC或其衍生物的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID); 以及(b)与标靶上的表面分子相互作用的标靶相互作用域(TID), 用于治疗受试者的疾病或病状。TID可以包含多肽。多肽可以基于或来源于抗体或抗体片段。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗BCMA抗体。TID可以包含抗体片段。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以经由非天然氨基酸位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三

唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。TID可以包含与标靶上的表面分子相互作用。表面分子可以是BCMA。BCMA可以在B细胞上。BCMA可以在浆细胞上。BCMA可以在浆B细胞上。BCMA可以在原生质细胞上。BCMA可以在效应B细胞上。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是多发性骨髓瘤。

[0453] 本文进一步公开了开关的用途,这种开关包含(a)包含FITC或其衍生物的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)与标靶上的表面分子相互作用的标靶相互作用域(TID),用于治疗受试者的疾病或病状。TID可以包含多肽。多肽可以基于或来源于抗体或抗体片段。抗体可以选自由抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD20抗体、抗EGFR抗体、抗EGFRvIII抗体、抗Her2抗体、抗CS1抗体、抗BCMA抗体、抗CEA抗体、抗CLL-1抗体以及抗CD33抗体组成的群组。抗体可以是抗EGFRvIII抗体。TID可以包含抗体片段。TID可以包含有包含非天然氨基酸的多肽。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以经由非天然氨基酸位点特异性地附接至TID。CAR-ID可以按位点非依赖性方式附接至TID。开关可以进一步包含连接子。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。TID可以包含与标靶上的表面分子相互作用。表面分子可以是受体。受体可以是生长因子受体。生长因子受体可以是EGFR。EGFR可以是EGFRvIII。表面分子可以在来自胶质瘤的细胞上。表面分子可以在来自成胶质细胞瘤的细胞上。表面分子可以在胶质细胞上。表面分子可以在室管膜细胞、星形细胞或少突细胞上。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是脑肿瘤。癌症可以是胶质瘤。癌症可以是成胶质细胞瘤。

[0454] 本文公开了开关的用途,这种开关包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)标靶相互作用域(TID),其中CAR-ID和TID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸,以治疗有需要的受试者的疾病或病状。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以包含FITC。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐。开关可以进一步包含连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID上的预定位点。CAR-ID可以通过FITC的异硫氰酸酯偶联至TID而附接至TID。CAR-ID可以通过酯偶合附接至TID。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以使CAR-ID通过点击化学反应附接至TID。连接子可以附接至CAR-ID。连接子可以化学附接至CAR-ID。连接子可以通过肟接合附接至CAR-ID。CAR-ID可以通过FITC的异硫氰酸酯偶联至连接子而附接至连接子。CAR-ID可以通过酯偶合附接至连接子。连接子可以附接至TID。连接子可以化学附接至TID。连接子可以通过肟接合附接至TID。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是前列腺癌。癌症可以是卵巢癌。

[0455] 本文公开了小分子CAR-EC开关的用途,这种开关包含(a)嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)标靶相互作用域(TID),其中CAR-ID和TID不包含两个或更多个由酰胺键连接的氨基酸,以制造用以治疗疾病的药物。CAR-ID可以包含小分子。CAR-ID可以包含

FITC。TID可以包含小分子。TID可以包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物。TID可以包含叶酸盐。开关可以进一步包含连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID上的预定位点。CAR-ID可以通过FITC的异硫氰酸酯偶联至TID而附接至TID。CAR-ID可以通过酯偶合附接至TID。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以使CAR-ID通过点击化学反应附接至TID。连接子可以附接至CAR-ID。连接子可以化学附接至CAR-ID。连接子可以通过肟接合附接至CAR-ID。CAR-ID可以通过FITC的异硫氰酸酯偶联至连接子而附接至连接子。CAR-ID可以通过酯偶合附接至连接子。连接子可以附接至TID。连接子可以化学附接至TID。连接子可以通过肟接合附接至TID。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是前列腺癌。癌症可以是卵巢癌。

[0456] 本文进一步公开了开关的用途,这种开关包含(a)包含FITC的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸或其衍生物的标靶相互作用域(TID),以治疗疾病或病状。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是前列腺癌。开关可以进一步包含连接子。连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID上的预定位点。CAR-ID可以通过FITC的异硫氰酸酯偶联至TID而附接至TID。CAR-ID可以通过酯偶合附接至TID。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以使CAR-ID通过点击化学反应附接至TID。连接子可以附接至CAR-ID。连接子可以化学附接至CAR-ID。连接子可以通过肟接合附接至CAR-ID。CAR-ID可以通过FITC的异硫氰酸酯偶联至连接子而附接至连接子。CAR-ID可以通过酯偶合附接至连接子。连接子可以附接至TID。连接子可以化学附接至TID。连接子可以通过肟接合附接至TID。

[0457] 本文公开了开关的用途,这种开关包含(a)包含FITC的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID);以及(b)包含叶酸盐或其衍生物的标靶相互作用域(TID),以治疗疾病或病状。连接子。连接子可以是双功能连接子。连接子可以是异双功能连接子。连接子可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)亚单元。连接子可以包含环辛炔。连接子可以是PEG-环辛炔连接子。连接子可以包含叠氮。连接子可以包含三唑。三唑可以是1,2,3-三唑。三唑可以是1,2,4-三唑。CAR-ID可以附接至TID。CAR-ID可以按位点特异性方式附接至TID。CAR-ID可以附接至TID上的预定位点。CAR-ID可以通过FITC的异硫氰酸酯偶联至TID而附接至TID。CAR-ID可以通过酯偶合附接至TID。连接子可以使CAR-ID附接至TID。连接子可以使CAR-ID通过点击化学反应附接至TID。连接子可以附接至CAR-ID。连接子可以化学附接至CAR-ID。连接子可以通过肟接合附接至CAR-ID。CAR-ID可以通过FITC的异硫氰酸酯偶联至连接子而附接至连接子。CAR-ID可以通过酯偶合附接至连接子。连接子可以附接至TID。连接子可以化学附接至TID。连接子可以通过肟接合附接至TID。疾病或病状可以是癌症。癌症可以是卵巢癌。

[0458] 本文所公开的方法可以包括施用一个或多个效应细胞。一个或多个效应细胞可以包含本文所公开的嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)中的任一者。一个或多个效应细胞可以

包含编码嵌合抗原受体(CAR)的聚核苷酸。CAR可以由SEQ ID NO:1-4中的任一者的核苷酸序列编码。CAR可以包含基于或来源于抗体的外域。CAR的外域可以基于或来源于抗FITC抗体。CAR的外域可以基于或来源于抗FITC scFv。开关和CAR-EC可以同时施用。开关和CAR-EC可以依序施用。这些方法可以包括施用第一效应细胞和第二效应细胞。第一效应细胞和第二效应细胞可以是不同的。第一效应细胞和第二效应细胞可以是相同的。第一效应细胞和第二效应细胞可以属于相同细胞类型。第一效应细胞和第二效应细胞可以属于相同细胞谱系。第一效应细胞可以包含具有结合第一CAR-EC开关的第一CAR-ID的第一胞外域的CAR并且第二效应细胞可以包含具有结合第二CAR-EC开关的第二CAR-ID的第二胞外域的CAR。第一CAR-ID和第二CAR-ID可以是不同的。第一CAR-ID和第二CAR-ID可以是相同的。第一CAR-IEC开关和第二CAR-EC开关可以是不同的。第一CAR-EC开关和第二CAR-EC开关可以包含不同的TID。第一CAR-EC开关和第二CAR-EC开关可以是相同的。第一CAR-EC开关和第二CAR-EC开关可以包含相同的TID。

[0459] CAR-EC开关可以具有治疗作用,因为其使效应细胞接近标靶细胞。对CAR-EC开关的预期适应症的治疗作用可以归因于CAR-EC开关使效应细胞募集至标靶细胞。对CAR-EC开关的预期适应症的治疗作用可以完全归因于CAR-EC开关使效应细胞募集至标靶细胞。对CAR-EC开关的预期适应症的治疗作用可以主要归因于CAR-EC开关使效应细胞募集至标靶细胞。

[0460] 对预期适应症的治疗作用可以归因于CAR-EC开关使蛋白质、肽或生物分子募集至标靶细胞。对预期适应症的治疗作用可以完全归因于CAR-EC开关使蛋白质、肽或生物分子募集至标靶细胞。对预期适应症的治疗作用可以至少部分归因于CAR-EC开关使蛋白质、肽或生物分子募集至标靶细胞。

[0461] 施用CAR-EC开关在未进一步施用效应细胞的情况下可能不具有任何治疗作用。CAR-EC开关在未进一步施用效应细胞的情况下可能不具有显著、所需和/或预期的治疗作用。CAR-EC开关在未进一步施用效应细胞的情况下对CAR-EC平台的预期适应症可能不具有任何治疗作用。CAR-EC开关的部分或组分(例如,TID)在未偶联至CAR-EC开关的第二部分或组分(例如,CAR-ID)的情况下对CAR-EC开关的预期适应症可能不具有治疗作用。CAR-EC开关的部分或组分(例如,CAR-ID、TID)当作为CAR-EC平台的一部分施用以提供治疗作用时的剂量在CAR-EC开关的部分或组分单独以那个剂量施用时可能不具有治疗作用。CAR-EC开关的部分或组分可能并不预期具有除了使效应细胞募集至标靶细胞以外的任何治疗作用。CAR-EC开关的部分或组分可能对标靶细胞具有治疗作用,其中治疗作用相对于CAR-EC开关使效应细胞、蛋白质、肽或生物分子募集至标靶细胞的治疗作用是可忽略的。CAR-EC开关的部分或组分可能对标靶细胞具有治疗作用,其中治疗作用小于使效应细胞募集至标靶细胞的治疗作用。CAR-EC开关的部分或组分结合至标靶细胞可以诱导来自标靶细胞的无意反应。CAR-EC开关的部分或组分结合至标靶细胞可以诱导除了使效应细胞、蛋白质、肽或生物分子募集至标靶细胞的治疗作用以外的无意治疗作用。

[0462] 本文公开了用于治疗受试者的疾病或病状的平台、试剂盒以及方法。受试者可以罹患疾病或病状。受试者可以罹患多于一种疾病或病状。受试者可以罹患慢性淋巴细胞白血病。受试者可以罹患急性成淋巴细胞白血病。受试者可以是动物。受试者可以是哺乳动物。哺乳动物可以是人类、黑猩猩、大猩猩、猴、牛、马、驴、骡、犬、猫、猪、兔、山羊、绵羊、大

鼠、仓鼠、天竺鼠或小鼠。受试者可以是鸟或鸡。受试者可以是人类。受试者可以是成人。受试者可以是儿童。儿童可以罹患急性成淋巴细胞白血病。受试者可以小于6月龄。受试者可以至少约1岁、约2岁、约3岁、约4岁、约5岁、约6岁、约7岁、约8岁、约9岁、约10岁、约11岁、约12岁、约13岁、约14岁或约15岁。受试者可以至少约16岁、约17岁或约18岁。受试者可以至少约19岁、约20岁或约25岁。受试者可以至少约30岁、约35岁、约40岁、约45岁、约50岁、约55岁。受试者可以至少约60岁、约65岁、约70岁、约75岁、约80岁或约85岁。受试者可以约90岁、约95岁、约100岁或约105岁。受试者可以大于65岁。受试者可以小于30岁。

[0463] 本文所公开的开关和开关中间物可以用于治疗有需要的受试者的一种或多种疾病或病状。疾病或病状可以是癌症、病原体感染、自体免疫疾病、发炎性疾病或遗传病症。

[0464] 在一些情况下,一种或多种疾病包括癌症。癌症可以包括复发性 and/或难治性癌症。癌症可以是急性癌症。癌症可以是慢性癌症。癌症可以是复发性癌症。癌症可以是加速的难治性癌症。癌症可以处于缓解期。癌症可以是I期、II期、III期或IV期癌症。癌症可以是青少年癌症。癌症可以是成人癌症。癌症的实例包括(但不限于)肉瘤、癌瘤、淋巴瘤或白血病。疾病或病状可以是细胞增殖性病症。细胞增殖性病症可以选自实体肿瘤、淋巴瘤、白血病以及脂肉瘤。癌症可以选自骨髓性白血病、成淋巴细胞白血病、髓系白血病、急性髓系白血病、骨髓单核细胞白血病、中性粒细胞白血病、骨髓增生异常综合症、B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(burkitt lymphoma)、大细胞淋巴瘤、混合细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(hodgkin lymphoma)、复发性小淋巴细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、多发性骨髓瘤、嗜碱性粒细胞白血病、嗜酸性粒细胞白血病、成巨核细胞白血病、成单核细胞白血病、单核细胞白血病、红白血病、红系白血病以及肝细胞癌。癌症可以包括血液恶性病。血液恶性病可以包括B细胞恶性病。癌症可以包括慢性淋巴细胞白血病。癌症可以包括急性成淋巴细胞白血病。癌症可以包括CD19阳性伯基特氏淋巴瘤。

[0465] 癌症可以包括神经内分泌癌。癌症可以包括胰腺癌。癌症可以包括外分泌胰腺癌。癌症可以包括甲状腺癌。甲状腺癌可以包括髓样甲状腺癌。

[0466] 癌症可以包括前列腺癌。前列腺癌可以是PSMA阳性前列腺癌。PSMA表达在一些或所有期数的前列腺癌中可能高度上调并且局限于癌细胞。癌症可以是激素难治性前列腺癌。

[0467] 癌症可以包括上皮癌。癌症可以包括乳癌。癌症可以包括子宫内膜癌。癌症可以包括卵巢癌。卵巢癌可以包括间质卵巢癌。癌症可以包括子宫颈癌。

[0468] 癌症可以包括皮肤癌。皮肤癌可以包括新生血管皮肤癌。皮肤癌可以包括黑素瘤。

[0469] 癌症可以包括肾癌。

[0470] 癌症可以包括肺癌。肺癌可以包括小细胞肺癌。肺癌可以包括非小细胞肺癌。

[0471] 癌症可以包括结肠直肠癌。癌症可以包括胃癌。癌症可以包括结肠癌。

[0472] 癌症可以包括脑癌。脑癌可以包括脑肿瘤。癌症可以包括成胶质细胞瘤。癌症可以包括星形细胞瘤。

[0473] 癌症可以包括血癌。血癌可以包括白血病。白血病可以包括髓系白血病。癌症可以包括淋巴瘤。淋巴瘤可以包含非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)。

[0474] 癌症可以包括肉瘤。一般来说,肉瘤是骨、软骨、脂肪、肌肉、血管或者其它结缔或支持组织的癌症。肉瘤包括(但不限于)骨癌、纤维肉瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's

sarcoma)、恶性血管内皮瘤、恶性神经鞘瘤、双侧前庭神经鞘瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤(例如,泡状软部肉瘤、血管肉瘤、叶状囊肉瘤、皮肤纤维肉瘤、硬纤维瘤、上皮样肉瘤、骨外骨肉瘤、纤维肉瘤、血管外皮细胞瘤、血管肉瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、神经纤维肉瘤、横纹肌肉瘤以及滑膜肉瘤)。肉瘤可以包括尤文氏肉瘤。

[0475] 癌症可以是癌瘤。一般来说,癌瘤是始于上皮细胞的癌症,上皮细胞是覆盖体表,产生激素,并且构成腺体的细胞。经由非限制性实例,癌瘤包括乳癌、胰腺癌、肺癌、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、肾癌、膀胱癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、卵巢癌、脑癌、阴道癌、外阴癌、子宫癌、口腔癌、阴茎癌、睾丸癌、食道癌、皮肤癌、输卵管癌、头颈癌、胃肠间质癌、腺癌、皮肤或眼内黑色素瘤、肛门区癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、尿道癌、肾盂癌、输尿管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、垂体腺癌、中枢神经系统(CNS)赘瘤、原发性CNS淋巴瘤、脑干胶质瘤以及脊椎轴肿瘤。在一些情况下,癌症是皮肤癌,诸如基底细胞癌、鳞状、黑色素瘤、非黑色素瘤或光化性(日光性)角化病。

[0476] 在一些情况下,癌症是肺癌。肺癌可以始于从气管分支以支持肺(支气管)或肺的小气囊(肺泡)的气道。肺癌包括非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌以及间皮瘤。NSCLC的实例包括鳞状细胞癌、腺癌以及大细胞癌。间皮瘤可以是肺和胸腔的内衬(胸膜)或腹部的内衬(腹膜)的癌性肿瘤。间皮瘤可以归因于石棉暴露。癌症可以是脑癌,诸如成胶质细胞瘤。

[0477] 或者,癌症可以是中枢神经系统(CNS)肿瘤。CNS肿瘤可以归类为胶质瘤或非胶质瘤。胶质瘤可以是恶性胶质瘤、高级别胶质瘤、弥漫性内生性脑桥胶质瘤。胶质瘤的实例包括星形细胞瘤、少枝胶质瘤(或少枝胶质瘤和星形细胞瘤元素的混合物)以及室管膜瘤。星形细胞瘤包括(但不限于)低级别星形细胞瘤、间变性星形细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、毛细胞性星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤以及室管膜下巨细胞星形细胞瘤。少枝胶质瘤包括低级别少枝胶质瘤(或少枝星形细胞瘤)和间变性少枝胶质瘤。非胶质瘤包括脑膜瘤、垂体腺瘤、原发性CNS淋巴瘤以及成神经管细胞瘤。在一些情况下,癌症是脑膜瘤。

[0478] 白血病可以是急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病或慢性髓细胞白血病。白血病的额外类型包括毛细胞白血病、慢性骨髓单核细胞白血病以及青少年骨髓单核细胞白血病。

[0479] 淋巴瘤是淋巴细胞的癌症并且可以从B或T淋巴细胞发展。淋巴瘤的两种主要类型是霍奇金氏淋巴瘤,先前称为霍奇金氏病(Hodgkin's disease),和非霍奇金氏淋巴瘤。霍奇金氏淋巴瘤的特点是李-斯细胞(Reed-Sternberg cell)的存在。非霍奇金氏淋巴瘤是并非霍奇金氏淋巴瘤的所有淋巴瘤。非霍奇金淋巴瘤可以是惰性淋巴瘤和侵袭性淋巴瘤。非霍奇金氏淋巴瘤包括(但不限于)弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关的淋巴组织淋巴瘤(MALT)、小细胞淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、纵隔大B细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)、结节边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、结外边缘区B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤以及淋巴瘤样肉芽肿。

[0480] 癌症可以包括实体肿瘤。癌症可以包括肉瘤。癌症可以选自由膀胱癌、乳癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肺癌、黑色素瘤、骨髓瘤、甲状腺癌、胰腺癌、胶质瘤、脑恶性胶质瘤、成胶质细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌以及PSMA阳性前列腺癌组成的群组。癌症可以具有

不均匀的抗原表达。癌症可以具有调节的抗原表达。抗原可以是表面抗原。癌症可以不包括骨髓瘤。癌症可以不包括黑素瘤。癌症可以不包括结肠癌。癌症可以是急性成淋巴细胞白血病(ALL)。癌症可以是复发性ALL。癌症可以是难治性ALL。癌症可以是复发性、难治性ALL。癌症可以是慢性淋巴细胞白血病(CLL)。癌症可以是复发性CLL。癌症可以是难治性CLL。癌症可以是复发性、难治性CLL。

[0481] 癌症可以包括乳癌。乳癌可以是三阳性乳癌(雌激素受体、孕酮受体以及Her2阳性)。乳癌可以是三阴性乳癌(雌激素受体、孕酮受体以及Her2阴性)。乳癌可以是雌激素受体阳性。乳癌可以是雌激素受体阴性。乳癌可以是孕酮受体阳性。乳癌可以是孕酮受体阴性。乳癌可以包括Her2阴性乳癌。乳癌可以包括低表达Her2乳癌。乳癌可以包括Her2阳性乳癌。表达Her2的细胞系已经针对抗原密度充分表征,这反映了临床免疫组织化学表征,其将恶性病分类为0(<20,000个Her2抗原/细胞)、1+(100,000个Her2抗原/细胞)、2+(500,000个Her2抗原/细胞)以及3+(>2,000,000个Her2抗原/细胞)。本发明提供了治疗这类类别的乳癌的方法。乳癌可以包括归类为Her2 0的乳癌。乳癌可以包括归类为Her2 1+的乳癌。乳癌可以包括归类为Her2 2+的乳癌。乳癌可以包括归类为Her2 3+的乳癌。

[0482] 疾病或病状可以是病原体感染。病原体感染可以由一个或多个病原体引起。在一些情况下,病原体是细菌、真菌、病毒或原生动物。

[0483] 例示性病原体包括(但不限于):博德特氏菌(*Bordetella*)、疏螺旋体(*Borrelia*)、布鲁氏菌(*Brucella*)、弯曲杆菌(*Campylobacter*)、衣原体(*Chlamydia*)、嗜衣原体(*Chlamydophila*)、梭菌(*Clostridium*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、肠球菌(*Enterococcus*)、埃希氏菌(*Escherichia*)、弗朗西斯氏菌(*Francisella*)、嗜血杆菌(*Haemophilus*)、螺杆菌(*Helicobacter*)、军团菌(*Legionella*)、钩端螺旋体(*Leptospira*)、李斯特氏菌(*Listeria*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)、支原体(*Mycoplasma*)、奈瑟氏菌(*Neisseria*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、立克次氏体(*Rickettsia*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、链球菌(*Streptococcus*)、密螺旋体(*Treponema*)、弧菌(*Vibrio*)或耶尔森氏菌(*Yersinia*)。在一些情况下,由病原体引起的疾病或病状是结核病并且异质性样品包含来源于细菌结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的外来分子和来源于受试者的分子。在一些情况下,由细菌引起的疾病或病状是结核病;肺炎,其可以由诸如链球菌和假单胞菌的细菌引起;食源性疾病,其可以由诸如志贺氏菌、弯曲杆菌以及沙门氏菌的细菌引起;以及感染,诸如破伤风、伤寒、白喉、梅毒以及麻疯。疾病或病状可以是细菌性阴道病,由天然存在的细菌丛的失衡引起的阴道疾病。或者,疾病或病状是细菌性脑膜炎,脑膜(例如,覆盖脑和脊髓的保护膜)的细菌性发炎。由细菌引起的其它疾病或病状包括(但不限于)细菌性肺炎、尿路感染、细菌性胃肠炎以及细菌性皮肤感染。细菌性皮肤感染的实例包括(但不限于)脓疱病,其可以由金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)引起;丹毒,其可以由具有淋巴道扩散的深层表皮的链球菌细菌性感染引起;以及蜂窝组织炎,其可以由正常皮肤菌丛或由外源性细菌引起。

[0484] 病原体可以是真菌,诸如假丝酵母(*Candida*)、曲霉(*Aspergillus*)、隐球菌(*Cryptococcus*)、组织浆菌(*Histoplasma*)、肺囊虫(*Pneumocystis*)以及葡萄穗霉(*Stachybotrys*)。由真菌引起的疾病或病状的实例包括(但不限于)股癣、酵母感染、环癣以

及脚癣(athlete's foot)。

[0485] 病原体可以是病毒。病毒的实例包括(但不限于)腺病毒、柯萨奇病毒(coxsackievirus)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、肝炎病毒(例如,A型、B型以及C型肝炎)、单纯疱疹病毒(1型和2型)、巨细胞病毒、疱疹病毒、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、乳头状瘤病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒以及水痘-带状疱疹病毒。由病毒引起的疾病或病状的实例包括(但不限于)伤风、流感、肝炎、AIDS、水痘、风疹、腮腺炎、麻疹、疣以及脊髓灰质炎。

[0486] 病原体可以是原生动物,诸如棘阿米巴(*Acanthamoeba*)(例如,阿斯特罗尼棘阿米巴(*A. astronyxis*)、卡氏棘阿米巴(*A. castellanii*)、柯氏棘阿米巴(*A. culbertsoni*)、哈氏棘阿米巴(*A. hatchetti*)、多噬棘阿米巴(*A. polyphaga*)、皱棘阿米巴(*A. rhysodes*)、赫氏棘阿米巴(*A. healyi*)、迪维勒斯棘阿米巴(*A. divionensis*))、短粒虫(*Brachiola*)(例如,康氏短粒虫(*B. connori*)、小泡短粒虫(*B. vesicularum*))、隐孢子虫(*Cryptosporidium*)(例如,微小隐孢子虫(*C. parvum*))、环孢子虫(*Cyclospora*)(例如,卡耶塔环孢子虫(*C. cayetanensis*))、脑胞内原虫(*Encephalitozoon*)(例如,家兔脑胞内原虫(*E. cuniculi*)、贺伦脑胞内原虫(*E. hellem*)、肠道脑胞内原虫(*E. intestinalis*))、内阿米巴(*Entamoeba*)(例如,溶组织内阿米巴(*E. histolytica*))、肠微孢子虫(*Enterocytozoon*)(例如,毕氏肠微孢子虫(*E. bienersi*))、贾第鞭毛虫(*Giardia*)(例如,蓝氏贾第鞭毛虫(*G. lamblia*))、等孢子球虫(*Isospora*)(例如,贝氏等孢子球虫(*I. belli*))、微孢子虫(*Microsporidium*)(例如,非洲微孢子虫(*M. africanum*)、锡兰微孢子虫(*M. ceylonensis*))、耐格里原虫(*Naegleria*)(例如,福氏耐格里原虫(*N. fowleri*))、微粒子虫(*Nosema*)(例如,按蚊微粒子虫(*N. algerae*)、眼微粒子虫(*N. ocularum*))、匹里虫(*Pleistophora*)、气管普孢子虫(*Trachipleistophora*)(例如,害人气管普孢子虫(*T. anthropophthera*)、人气管普孢子虫(*T. hominis*))以及条纹微孢子虫(*Vittaforma*)(例如,角膜条纹微孢子虫(*V. corneae*))。

[0487] 疾病或病状可以是自体免疫疾病或自体免疫相关疾病。自体免疫病症可以是身体免疫系统的功能障碍,这导致身体攻击其自身的组织。自体免疫疾病和自体免疫相关疾病的实例包括(但不限于)阿狄森氏病(Addison's disease)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合症(APS)、自体免疫再生障碍性贫血、自体免疫溶血性贫血、自体免疫肝炎、自体免疫心肌炎、白塞氏病(Behcet's disease)、口炎性腹泻、克罗恩氏病(Crohn's disease)、皮炎、嗜酸性粒细胞筋膜炎、结节性红斑、巨细胞动脉炎(颞动脉炎)、古德帕斯彻氏综合症(Goodpasture's syndrome)、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、桥本氏病(Hashimoto's disease)、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、糖尿病、青少年糖尿病、川崎综合症(Kawasaki syndrome)、兰伯特-伊顿综合症(Lambert-Eaton syndrome)、狼疮(SLE)、混合结缔组织病(MCTD)、多发性硬化、重症肌无力、天疱疮、结节性多动脉炎、I型、II型以及III型自体免疫多腺综合症、风湿性多肌痛、多肌炎、牛皮癣、牛皮癣关节炎、赖特氏综合症(Reiter's syndrome)、复发性多软骨炎、类风湿性关节炎、肉状瘤病、硬皮病、修格兰氏综合症(Sjogren's syndrome)、精子和睾丸自体免疫、僵人综合症、高安氏动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癩风以及韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0488] 疾病或病状可以是发炎性疾病。发炎性疾病的实例包括(但不限于)牙槽炎、淀粉

样变性、脉管炎、强直性脊柱炎、无血管性坏死、巴塞多氏病(Basedow's disease)、贝尔氏麻痹(Bell's palsy)、滑囊炎、腕管综合症、乳糜泻、胆管炎、髌骨软骨软化症、慢性活动性肝炎、慢性疲劳综合症、科根氏综合症(Cogan's syndrome)、先天性髋关节发育不良、肋软骨炎、克罗恩氏病、囊性纤维化、狄克凡氏肌腱炎(De Quervain's tendinitis)、糖尿病相关的关节炎、弥漫性特发性骨肥厚、盘状狼疮、埃勒斯-当洛斯综合症(Ehlers-Danlos syndrome)、家族性地中海热、筋膜炎、纤维组织炎/纤维肌痛、冰冻肩、腱鞘囊肿、巨细胞动脉炎、痛风、格雷夫斯氏病、HIV相关的风湿病综合症、甲状旁腺功能亢进相关的关节炎、感染性关节炎、发炎性肠道综合症/肠易激综合症、青少年类风湿性关节炎、莱姆病(Lyme disease)、马凡氏综合症(Marfan's Syndrome)、米古利兹氏病(Mikulicz's Disease)、混合结缔组织病、多发性硬化、肌筋膜疼痛综合症、骨关节炎、骨软化症、骨质疏松症和皮质类固醇诱发的骨质疏松症、佩吉特氏病(Paget's Disease)、回纹型风湿病、帕金森氏病(Parkinson's Disease)、普鲁默氏病(Plummer's Disease)、风湿性多肌痛、多肌炎、假性痛风、牛皮癣关节炎、雷诺氏现象/综合症(Raynaud's Phenomenon/Syndrome)、赖特氏综合症、风湿热、类风湿性关节炎、肉状瘤病、坐骨神经痛(腰椎间盘突出)、硬皮病、坏血病、镰状细胞关节炎、修格兰氏综合症、椎管狭窄、脊椎滑脱、斯提耳氏病(Still's Disease)、全身性红斑狼疮、高安氏(无脉)病、肌腱炎、网球肘/高尔夫肘、甲状腺相关的关节炎、扳机指、溃疡性结肠炎、韦格纳氏肉芽肿病以及惠普耳氏病(Whipple's Disease)。

[0489] 本文所公开的治疗方法可以包括如由细胞因子水平测量的脱靶活性。这种方法当与其它CAR-EC疗法相比时可以降低如由细胞因子水平测量的脱靶活性。这种方法可以降低如由干扰素 γ 水平测量的脱靶活性。可以降低的其它脱靶活性包括毒性淋巴细胞减少症、实体肿瘤标靶的致命性细胞溶解以及血液标靶的慢性低丙种球蛋白血症。本文所公开的治疗方法和组合物可以用于治疗包含CD19介导的B细胞发育不全的癌症。方法和组合物可以使CD19介导的B细胞发育不全减至最低。这种方法可以避免长期B细胞发育不全。

[0490] 本文所公开的CAR-EC平台、方法以及组合物可以用于治疗有需要的受试者的异质性肿瘤或异质性血细胞恶性病。“泛B细胞”标志物CD20是B细胞赘瘤的最普遍靶向的抗原并且FDA批准的抗体利妥昔单抗是许多白血病和淋巴瘤治疗中至关重要的组分。然而，与CD20抗原表达的调节相关的抗性机制在相当数量的患者中出现。显然，用单独的CD19或CD20抗原靶向对于治愈性疗法是不足够的。本文所公开的方法提供了具有不同特异性的两个或更多个开关(例如，抗CD19抗体CAR-EC开关和抗CD20抗体CAR-EC开关)的构建和施用。本文所公开的方法提供了具有不同特异性的两个或更多个开关(例如，抗CD19抗体CAR-EC开关和抗CD22抗体CAR-EC开关)的构建和施用。异质性肿瘤或异质性血细胞恶性病可以用第一抗体CAR-EC开关和第二抗体CAR-EC开关治疗，其中CAR-EC开关结合两个不同靶标。一个或多个CAR-EC开关可以依序或同时施用。

[0491] CAR-EC开关可以与一种或多种额外的治疗剂一起施用。一种或多种额外的治疗剂可以选自免疫疗法、化学疗法以及类固醇组成的群组。一种或多种额外的治疗剂可以是化学疗法药物。化学疗法药物可以是烷化剂、抗代谢物、蒽环霉素(anthracycline)、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇或分化剂。化学疗法药物可以选自放线菌素D(actinomycin-D)、博来霉素(bleomycin)、六甲蜜胺(al tretamine)、硼替佐米(bortezomib)、白消安(busulfan)、卡铂(carboplatin)、卡培他滨(capecitabine)、卡莫司

汀(carmustine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂(cisplatin)、克拉屈滨(cladribine)、氯法拉滨(clofarabine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、阿糖胞苷(cytarabine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、道诺霉素(daunorubicin)、多烯紫杉醇(docetaxel)、阿霉素、表柔比星(epirubicin)、依托泊苷(etoposide)、雌莫司汀(estramustine)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶(flourouracil)、吉西他滨(gemcitabine)(Gemzar)、羟基脲(hydroxyurea)、伊达比星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)(Camptosar)、伊沙匹隆(ixabepilone)、L-天冬酰胺酶、洛莫司汀(lomustine)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、美法仑(melphalan)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、丝裂霉素C(mitomycin-C)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)(Taxol)、培美曲塞(pemetrexed)、喷司他丁(pentostatin)、链脲菌素(streptozocin)、替莫唑胺(temozolomide)、替尼泊苷(teniposide)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、塞替派(thiotepa)、拓扑替康(topotecan)(Hycamtin)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、长春瑞滨(vinorelbine)、类视色素(retinoid)、维甲酸(tretinoin)(ATRA或Atralin[®])、蓓萨罗丁(bexarotene)(Targretin[®])以及三氧化二砷(Arsenox[®])。化学疗法可以作为供吞咽的丸剂、作为至肌肉或脂肪组织中的注射剂静脉内、局部或直接施用于体腔中。

[0492] 一种或多种额外的治疗剂可以包括血管生成抑制剂。血管生成抑制剂可以选自贝伐单抗(bevacizumab)、伊曲康唑(itraconazole)、羧胺三唑(carboxyamidotriazole)、TNP-470、CM101、IFN α 、IL-12、血小板因子4、苏拉明(suramin)、SU5416、血小板反应蛋白(thrombospondin)、VEGFR拮抗剂、具有肝素的血管抑制类固醇、源自CAR-ECilage的血管生成抑制因子、基质金属蛋白酶抑制剂、血管抑素(angiostatin)、内皮抑素(endostatin)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、依维莫司(everolimus)、2-甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol)、替可加兰(tecogalan)、四硫钼酸盐(tetrathiomolybdate)、沙利度胺(thalidomide)、催乳素(prolactin)、 $\alpha\text{v}\beta_3$ 抑制剂、利诺胺(linomide)、他喹莫德(tasquinimod)、可溶性VEGFR-1、可溶性NRP-1、血管生成素2(angiopoietin 2)、血管抑制因子(vasostatin)、钙网蛋白(calreticulin)、TIMP、CD41、Meth-1、Meth-2、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、CXCL10、IL-4、IL-12、IL-18、凝血酶原(prothrombin)、抗凝血酶III片段、催乳素、VEGF、SPARC、骨桥蛋白(osteopontin)、乳腺丝抑蛋白(maspin)、血管能抑素(canstatin)、增殖蛋白相关蛋白(proliferin-related protein)以及休眠蛋白(restin)。

[0493] 一种或多种额外的治疗剂可以包括激素疗法。激素疗法可以选自抗雌激素(例如, 氟维司群(fulvestrant)(Faslodex[®])、他莫昔芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)(Fareston[®]); 芳香酶抑制剂(例如, 阿那曲唑(anastrozole)(Arimidex[®])、依西美坦(exemestane)(Aromasin[®])、来曲唑(letrozole)(Femara[®]); 孕酮(例如, 醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)(Megace[®]); 雌激素; 抗雄激素(例如, 比卡鲁胺(bicalutamide)(Casodex[®])、氟他胺(flutamide)(Eulexin[®])、尼鲁米特(nilutamide)(Nilandron[®]); 促性腺激素释放激素(GnRH)或促黄体激素释放激素(LHRH)激动剂或类

似物(例如,亮丙瑞林(leuprolide)(**Lupron**[®]),戈舍瑞林(goserelin)(**Zoladex**[®]))。

[0494] 一种或多种额外的治疗剂可以包括类固醇。类固醇可以是皮质类固醇。类固醇可以是皮质醇或其衍生物。类固醇可以选自强的松(prednisone)、甲基强的松龙(methylprednisolone)(**Solumedrol**[®])或地塞米松(dexamethasone)。

[0495] CAR-EC开关可以与一种或多种额外的疗法一起施用。一种或多种额外的疗法可以包括激光疗法。一种或多种额外的疗法可以包括放射疗法。一种或多种额外的疗法可以包括手术。

[0496] CAR-EC调控剂

[0497] 在一些情况下,可能需要从受试者去除非活性的嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)或下调CAR-EC对嵌合抗原受体(CAR)的表达。举例来说,CAR-EC可以从受试者引出免疫反应并且可能需要下调CAR的表达以消除免疫反应。或者,可能需要触发CAR-EC的细胞死亡。本文公开了调控受试者中的CAR-EC的方法,这种方法包括施用CAR-EC调控剂。不同于活化CAR-EC并且将CAR-EC的活性引导至标靶的本文所公开的开关,CAR-EC调控剂可以与CAR-EC上的表面分子相互作用以诱导CAR表达的下调或诱导CAR-EC的程序性细胞死亡。CAR-EC可以包含编码CAR的聚核苷酸。CAR的表达可以由启动子控制。启动子可以是可调控的启动子。举例来说,CAR的表达可以由Tet启动子控制。在不存在四环素(tetracycline)或其衍生物(例如,强力霉素(doxycycline))的情况下,CAR-EC可以表达CAR。在存在四环素或其衍生物的情况下,CAR的表达受抑制。因此,CAR-EC调控剂可以包含抑制CAR表达的分子(例如,四环素、强力霉素)。CAR的表达可以由嵌合可调控系统控制。CAR-EC调控剂可以包含可以与已经工程改造成编码CAR的聚核苷酸的特异性序列相互作用的转活化子。嵌合系统可以由四环素、孕酮拮抗剂RU486、昆虫激素蜕皮素(ecdysone)或雷帕霉素(rapamycin)(FK506)调控。这些药物或激素(或其类似物)可以对由天然或突变体配体结合域以及固有或非固有的DNA结合和转录活化域组成的调节剂转活化子起作用。(Agha-Mohammadi和Lotze,可调控系统:在基因疗法和复制病毒中的应用(Regulatable systems:applications in gene therapy and replicating viruses),《临床研究杂志(J Clin Invest.)》,105(9):1177-1183,2000,以全文引用的方式并入)。

[0498] CAR-EC调控剂可以包含与CAR-EC的CAR相互作用的分子。CAR-EC调控剂可以与CAR-EC开关竞争CAR-EC上的CAR。CAR-EC调控剂可以包含小分子。CAR-EC调控剂可以包含肽。肽可以是抗体或抗体片段。

[0499] CAR-EC调控剂可以进一步包含药物或毒素。药物或毒素可以偶联至与CAR-EC的CAR相互作用的CAR-EC调控剂的部分。药物或毒素可以选自美登素(maytansine)(例如,DM1、DM4)、单甲基澳瑞他汀E(monomethylauristatin E)、单甲基澳瑞他汀F(monomethylauristatin F)、Ki-4.dgA、尾海兔素10(dolastatin 10)、加利车霉素(calicheamicin)、SN-38、倍癌霉素(duocarmycin)、伊立替康、蓖麻毒素(ricin)、皂草素(saporin)、白树毒素(geloinin)、美洲商陆抗病毒蛋白、绿脓假单胞菌(pseudomonas aeruginosa)外毒素A或白喉毒素。毒素可以包含毒药、细菌毒素(例如,引起破伤风的细菌毒素,白喉)、植物毒素或动物毒素。毒素可以是蛇毒。毒素可以包含长春碱。毒素可以包含澳瑞他汀(auristatin)。毒素可以含于脂质体膜包覆的囊泡中。抗体可以附接至脂质体膜

包覆的囊泡。

[0500] 图17A-C示出了例示性CAR调控剂-CAR-EC相互作用的示意图。如图17A中所示,嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)(1701)可以包含嵌合抗原受体(1704)和共刺激分子(1720)。CAR(1704)可以包含外域(1715)、跨膜域(1710)以及内域(1705)。CAR-EC调控剂(1725)可以与CAR(1704)的外域(1715)相互作用。CAR-EC调控剂(1725)衔接至CAR(1704)可以诱导CAR-EC的凋亡。CAR-EC调控剂(1725)衔接至CAR(1704)可以诱导CAR-EC的活化诱导的细胞死亡。CAR-EC调控剂(1725)衔接至CAR(1704)可以诱导CAR-EC的自体吞噬。CAR-EC调控剂(1725)衔接至CAR(1704)可以诱导CAR的下调。CAR-EC调控剂(1725)衔接至CAR(1704)可以防止CAR-EC开关衔接至CAR。

[0501] 如图17B中所示,嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)(1730)可以包含嵌合抗原受体(CAR)(1731)、共刺激分子(1750)以及表面分子(1755)。CAR(1731)可以包含外域(1745)、跨膜域(1740)以及内域(1735)。CAR-EC调控剂(1760)可以包含与CAR(1731)的外域(1715)相互作用的第一端(1765)和与CAR-EC上的表面分子(1755)相互作用的第二端(1770)。CAR-EC调控剂(1760)的一端衔接至CAR-EC(1730)的CAR(1731)和表面分子(1755)可以诱导CAR-EC的凋亡。CAR-EC调控剂(1760)的一端衔接至CAR-EC(1730)的CAR(1731)和表面分子(1755)可以诱导CAR-EC的活化诱导的细胞死亡。CAR-EC调控剂(1760)的一端衔接至CAR-EC(1730)的CAR(1731)和表面分子(1755)可以诱导CAR-EC的自体吞噬。CAR-EC调控剂(1760)的一端衔接至CAR-EC(1730)的CAR(1731)和表面分子(1755)可以诱导CAR的下调。CAR-EC调控剂(1765)的一端衔接至CAR(1731)可以防止CAR-EC开关衔接至CAR。

[0502] 如图17C中所示,嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)(1775)可以包含嵌合抗原受体(1774)和共刺激分子(1779)。CAR(1774)可以包含外域(1778)、跨膜域(1777)以及内域(1776)。CAR-EC调控剂(1780)可以包含与效应细胞上的CAR(1774)的外域(1778)相互作用的第一区(1781)。CAR-EC调控剂(1780)可以进一步包含与另一个细胞(1790)上的表面分子(1791)相互作用的第二区(1782)。细胞(1790)可以分泌可以与CAR-EC相互作用的细胞因子或其它分子。细胞因子或其它分子与CAR-EC的相互作用可以诱导CAR-EC的凋亡。细胞因子或其它分子与CAR-EC的相互作用可以诱导CAR-EC的活化诱导的细胞死亡。细胞因子或其它分子与CAR-EC的相互作用可以诱导CAR-EC的自体吞噬。细胞因子或其它分子与CAR-EC的相互作用可以诱导CAR的下调。CAR-EC调控剂(1781)的一端衔接至CAR(1774)可以防止CAR-EC开关衔接至CAR。

[0503] CAR-EC可以包含经过修饰以表达可以与CAR-EC调控剂相互作用的表面分子的效应细胞。CAR-EC上的表面分子可以是病毒蛋白或其片段。替代地或另外,效应细胞表达并非细胞表面标志物的病毒蛋白或其片段。表达病毒蛋白或其片段的效应细胞可以用药物靶向。在效应细胞包含病毒蛋白或其片段的情况下,药物可以选自包含以下的群组:阿巴卡韦(abacavir)、阿昔洛韦(acyclovir)、阿德福韦(adefovair)、金刚烷胺(amantadine)、安普那韦(amprenavir)、安普利近(ampligen)、阿比朵尔(arbidol)、阿扎那韦(atazanavir)、立普妥(atripla)、巴拉弗(balavir)、波普瑞韦尔特(boceprevirertet)、西多福韦(cidofovir)、可比韦(combivir)、地瑞纳韦(darunavir)、地拉韦定(delavirdine)、地达诺新(didanosine)、二十二醇、依度尿苷(edoxudine)、依法韦仑(efavirenz)、恩曲他滨(emtricitabine)、恩夫韦地(enfuvirtide)、恩替卡韦(entecavir)、进入抑制剂、泛昔洛韦

(famciclovir)、固定剂量组合抗逆转录病毒药物、福米韦生(fomivirsen)、福沙那韦(fosamprenavir)、膦甲酸(foscarnet)、膦乙酸(fosfonet)、融合抑制剂、更昔洛韦(ganciclovir)、伊巴他滨(ibacitabine)、伊木那韦(imunovir)、碘苷(idoxuridine)、咪喹莫特(imiquimod)、茚地那韦(indinavir)、肌苷、整合酶抑制剂、III型干扰素、II型干扰素、I型干扰素、干扰素、拉米夫定(lamivudine)、洛匹那韦(lopinavir)、洛韦胺(loviride)、马拉韦罗(maraviroc)、吗啉胍(moroxydine)、甲吡唑酮(methisazone)、奈非那韦(nelfinavir)、奈韦拉平(nevirapine)、奈克沙韦(nexavir)、核苷类似物、奥司他韦(oseltamivir)、聚乙二醇干扰素 α -2a(peginterferon alfa-2a)、喷昔洛韦(penciclovir)、帕拉米韦(peramivir)、普拉康纳利(pleconaril)、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、蛋白酶抑制剂、雷特格韦(raltegravir)、逆转录酶抑制剂、利巴韦林(ribavirin)、金刚乙胺(rimantadine)、利托那韦(ritonavir)、普拉咪定(pyrimidine)、沙奎那韦(saquinavir)、索非布韦(sofosbuvir)、司他夫定(stavudine)、协同增强剂逆转录病毒药物、茶树油、特拉匹韦(telaprevir)、替诺福韦(tenofovir)、替诺福韦二吡呋酯(tenofovir disoproxil)、替拉那韦(tipranavir)、三氟尿苷(trifluridine)、三协唯(trizivir)、曲金刚胺(tromantadine)、特鲁瓦达(truvada)、伐昔洛韦(valaciclovir)、维克韦罗(vicriviroc)、阿糖腺苷(vidarabine)、韦拉米啉(viramidine)、扎西他滨(zacitabine)、扎那米韦(zanamivir)或齐多夫定(zidovudine)。药物可以是更昔洛韦。药物可以是阿昔洛韦。

[0504] 医药组合物

[0505] 本文所公开的开关、开关中间物以及CAR-EC可以用于一种或多种组合物的配方中。组合物可以是医药组合物。包含一个或多个开关、开关中间物和/或CAR-EC的组合物可以进一步包含一种或多种医药学上可接受的盐、赋形剂或媒剂。医药学上可接受的盐、赋形剂或媒剂包括(但不限于)载剂、赋形剂、稀释液、抗氧化剂、防腐剂、着色剂、调味剂和稀释剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、填充剂、膨胀剂、缓冲液、递送媒剂、张度剂、共溶剂、湿润剂、复合剂、缓冲剂、抗微生物剂以及表面活性剂。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是例示性的适当载剂。

[0506] 组合物可以包括抗氧化剂,诸如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖以及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐平衡离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如吐温(Tween)、普朗尼克(pluronic)或聚乙二醇(PEG)。同样经由实例,适合的张度增强剂包括碱金属卤化物(优选氯化钠或氯化钾)、甘露糖醇、山梨糖醇等等。适合的防腐剂包括苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、硫柳汞(thimerosal)、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定(chlorhexidine)、山梨酸等等。过氧化氢也可以用作防腐剂。适合的共溶剂包括甘油、丙二醇以及PEG。适合的复合剂包括咖啡碱、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟基-丙基- β -环糊精。适合的表面活性剂或湿润剂包括脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯(诸如聚山梨醇酯80)、缓血酸胺、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal)等等。缓冲液可以是常规缓冲液,诸如乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐或Tris-HCl。乙酸盐缓冲液可以为约pH 4-5.5,并且Tris缓冲液可以为约pH 7-8.5。额外的医药剂阐述于

《雷明顿氏制药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第18版,A.R.Gennaro编,Mack Publishing Company,1990中。

[0507] 组合物可以呈液体形式、冻干形式或冷冻干燥形式。组合物可以包括一种或多种冻干保护剂、赋形剂、表面活性剂、高分子量结构添加剂和/或膨胀剂(参看例如美国专利号6,685,940、6,566,329以及6,372,716)。在一个实施方案中,包括冻干保护剂,其为非还原糖,诸如蔗糖、乳糖或海藻糖。一般包括的冻干保护剂的量使得在复原后,所得配方将是等张的,不过高张或稍低张配方也可能是适合的。另外,冻干保护剂的量应足以防止蛋白质在冻干后以不可接受的量降解和/或聚集。预冻干配方中糖(例如,蔗糖、乳糖、海藻糖)的例示性冻干保护剂浓度为约10mM至约400mM。在另一个实施方案中,包括表面活性剂,诸如非离子表面活性剂和离子表面活性剂,诸如聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80);泊洛沙姆(poloxamer)(例如,泊洛沙姆188);聚(乙二醇)苯基醚(例如,Triton);十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基-或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺丙基-、椰油酰胺丙基-、亚油酰胺丙基-、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如,月桂酰胺丙基);肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-二甲胺;甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油酰基牛磺酸二钠;以及MONAQUAT™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)、聚乙二醇、聚丙二醇,以及乙二醇与丙二醇的共聚物(例如,普朗尼克、PF68等等)。可以存在于预冻干配方中的表面活性剂的例示性量为约0.001-0.5%。高分子量结构添加剂(例如,填充剂、粘合剂)可以包括例如阿拉伯胶、白蛋白、海藻酸、磷酸钙(磷酸氢钙)、纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、葡聚糖、糊精、葡聚糖酸盐(dextrate)、蔗糖、泰乐士(tylose)、预胶凝化淀粉、硫酸钙、直链淀粉、甘氨酸、膨润土、麦芽糖、山梨糖醇、乙基纤维素、磷酸氢二钠、磷酸二钠、焦亚硫酸二钠、聚乙烯醇、明胶、葡萄糖、瓜尔胶、液体葡萄糖、可压缩糖、硅酸镁铝、麦芽糊精、聚氧化乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚维酮(povidone)、海藻酸钠、黄耆胶微晶纤维素、淀粉以及玉米蛋白。高分子量结构添加剂的例示性浓度为0.1%至10%(按重量计)。在其它实施方案中,可以包括膨胀剂(例如,甘露糖醇、甘氨酸)。

[0508] 组合物可以适合于肠道外施用。例示性组合物适合于通过熟练技工可用的任何途径注射或输注至动物中,这种途径诸如关节内、皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌肉内、眼内、动脉内或病灶内途径。肠道外配方通常将是无菌、无热原质、等张水溶液,任选地含有医药学上可接受的防腐剂。

[0509] 非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(诸如橄榄油)以及可注射有机酯(诸如油酸乙酯)。水性载剂包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠道外媒剂包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringers' dextrose)、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液(lactated Ringer's)或非挥发性油。静脉内媒剂包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(诸如基于林格氏右旋糖的那些)等等。防腐剂和/或其它添加剂也可以存在,诸如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等等。一般参看《雷明顿氏制药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第16版,Mack编,1980,其以全文引用的方式并入。

[0510] 可以配制本文所描述的医药组合物用于以提供产品的局部浓度(例如,大丸剂、积存效应)和/或在特定局部环境中增加的稳定性或半衰期的方式控制或持续递送。组合物可

以包含本文所公开的CAR-EC开关、多肽、核酸或载体与诸如聚乳酸、聚乙醇酸等等的聚合化合物的颗粒制剂以及诸如以下的试剂的配方:生物可降解基质、可注射微球、微囊粒子、微胶囊、生物可溶蚀粒子小珠、脂质体以及可植入递送装置,这些装置提供活性剂的控制或持续释放,然后可以作为积存注射而递送。用于配制这类持续或控制递送工具的技术是已知的并且已经开发多种聚合物并用于药物的控制释放和递送。这类聚合物通常是生物可降解和生物相容的。因为在捕集生物活性蛋白剂(例如,包含超长CDR3的抗体)中所涉及的温和和水性条件,所以可能需要聚合物水凝胶,包括通过对映体聚合物或多肽区段的复合形成的那些和具有温度或pH敏感特性的水凝胶,用于提供药物积存效应。参看例如WO 93/15722中用于递送医药组合物的控制释放多孔聚合微粒的描述。用于这个目的适合材料包括聚丙交酯(参看例如美国专利号3,773,919);聚(α -羟基羧酸)的聚合物,诸如聚-D(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988A);L-谷氨酸与 γ -L-谷氨酸乙酯的共聚物(Sidman等,《生物聚合物(Biopolymers)》,22:547-556(1983));聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(Langer等,《生物医学材料研究杂志(J.Biomed.Mater.Res.)》,15:167-277(1981),和Langer,《化学技术(Chem.Tech.)》,12:98-105(1982));乙烯乙酸乙烯酯;或聚-D(-)-3-羟基丁酸。其它生物可降解聚合物包括聚(内酯)、聚(缩醛)、聚(原酸酯)以及聚(原碳酸酯)。持续释放组合物还可以包括脂质体,其可以通过本领域中已知的若干方法中的任一者制备(参看例如Eppstein等,《美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,82:3688-92(1985))。载剂本身或其降解产物应在标靶组织中是无毒的并且不应进一步加重病状。这可以通过在标靶病症的动物模型中常规筛选来确定,或如果这类模型不可用,那么在正常动物中确定。用于持续释放的重组蛋白的微囊化已经用人生长激素(rhGH)、干扰素-(rhIFN-)、白介素-2以及MN rgp120成功地进行。Johnson等,《自然医学(Nat.Med.)》,2:795-799(1996);Yasuda,《生物医学理论(Biomed.Ther.)》,27:1221-1223(1993);Hora等,《生物/技术(Bio/Technology.)》8:755-758(1990);Cleland,“使用聚丙交酯聚乙交酯微球系统的单一免疫疫苗的设计和产生(Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems)”,《疫苗设计:亚单元和佐剂方法(Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach)》,Powell和Newman编,(Plenum Press:New York,1995),第439-462页;WO 97/03692、WO 96/40072、WO 96/07399;以及美国专利号5,654,010。这些蛋白质的持续释放配方使用聚乳酸-共乙醇酸(PLGA)聚合物来开发,这归因于这种聚合物的生物相容性和广泛范围的生物可降解特性。PLGA的降解产物,乳酸和乙醇酸,可以在人体内快速清除。此外,这种聚合物的可降解性可以取决于其分子量和组成。Lewis,“生物活性剂从丙交酯/乙交酯聚合物的控制释放(Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer)”,M.Chasin和R.Langer(编),《作为药物递送系统的生物可降解聚合物(Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems)》(Marcel Dekker:New York,1990),第1-41页。持续释放组合物的额外实例包括例如EP 58,481A;美国专利号3,887,699;EP 158,277A;加拿大专利号1176565;U.Sidman等,《生物聚合物(Biopolymers)》22,547[1983];R.Langer等,《化学技术(Chem.Tech.)》12,98[1982];Sinha等,《控制释放杂志(J.Control.Release)》90,261[2003];Zhu等,《自然生物技术(Nat.Biotechnol.)》18,24[2000];以及Dai等,《胶体表面B生物界面(Colloids Surf B Biointerfaces)》41,117[2005]。

[0511] 生物粘着聚合物也预期用于本发明的组合物中或与本发明的组合物一起使用。生物粘着剂是能够粘着至生物底物持续较长时段的合成和天然存在的材料。举例来说,卡波姆(Carbopol)和聚卡波非(polycarbophil)都是聚(丙烯酸)的合成交联衍生物。基于天然存在的物质的生物粘着递送系统包括例如透明质酸,也称为玻尿酸(hyaluronan)。透明质酸是由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰基-D-葡萄糖胺的残基组成的天然存在的粘多糖。透明质酸在脊椎动物的细胞外组织基质中发现,包括结缔组织中,以及滑液中和眼睛的玻璃体和房水中。已经使用透明质酸的酯化衍生物来产生用于递送的生物相容和生物可降解的微球(参看例如Cortivo等,《生物材料(Biomaterials)》(1991)12:727-730;EP 517,565;WO 96/29998;Illum等,《控制释放杂志(J.Controlled Rel.)》(1994)29:133-141)。

[0512] 生物可降解与非生物可降解的聚合基质都可以用于递送本公开的组合物,并且这类聚合基质可以包含天然或合成聚合物。生物可降解基质是优选的。释放发生的时段是基于聚合物的选择。通常,经过范围介于数小时与三至十二个月之间的时段释放是最合乎需要的。可以用于形成生物可降解递送系统的例示性合成聚合物包括:乳酸与乙醇酸的聚合物、聚酰胺、聚碳酸酯、聚烯、聚烷二醇、聚氧化烯、聚对苯二甲酸烷二酯、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚酐、聚氨酯和其共聚物、聚(丁酸)、聚(戊酸)、烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素、硫酸纤维素钠盐、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八酯)、聚乙烯、聚丙烯、聚(乙二醇)、聚(氧化乙烯)、聚(对苯二甲酸乙二酯)、聚(乙醇醇)、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯以及聚乙烯吡咯烷酮。例示性天然聚合物包括海藻酸盐和其它多糖,包括葡聚糖和纤维素、胶原蛋白、其化学衍生物(化学基团(例如,烷基、亚烷基)的取代、添加,羟基化,氧化,以及由本领域的技术人员常规制造的其它修饰)、白蛋白和其它亲水蛋白、玉米蛋白和其它醇溶谷蛋白以及疏水蛋白、其共聚物和混合物。一般来说,这些材料通过体内酶促水解或暴露于水、通过表面或本体溶蚀而降解。聚合物任选地呈水凝胶的形式(参看例如WO 04/009664;WO 05/087201;Sawhney等,《大分子(Macromolecules)》,1993,26,581-587),其可以在水中吸收至多其重量的约90%并且进一步任选地与多价离子或其它聚合物交联。

[0513] 递送系统还包括非聚合物系统,其为脂质,包括固醇,诸如胆固醇、胆固醇酯,以及脂肪酸或中性脂肪,诸如单酸甘油酯、二酸甘油酯以及三酸甘油酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡涂层;使用常规粘合剂和赋形剂的压缩片剂;部分融合植入物;等等。特定实例包括(但不限于):(a)溶蚀系统,其中产品以一定形式含于基质内,诸如美国专利号4,452,775、4,675,189和5,736,152中所描述的那些;以及(b)扩散系统,其中产品以控制的速率从聚合物渗透,诸如美国专利号3,854,480、5,133,974和5,407,686中所描述。含有产品的脂质体可以通过已知的方法制备,诸如(DE 3,218,121;Epstein等,《美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,82:3688-3692(1985);Hwang等,《美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,77:4030-4034(1980);EP 52,322;EP 36,676;EP 88,046;EP

143,949;EP 142,641;JP 83-118008;美国专利号4,485,045和4,544,545;以及EP 102,324)。

[0514] 替代地或另外,组合物可以经由植入膜的受影响区域中、海绵、或本文所公开的CAR-EC开关已经吸收或囊封于上面的其它适当材料来局部施用。在使用植入装置的情况下,装置可以植入任何适合的装置或器官中,并且本文所公开的CAR-EC开关、核酸或载体的递送可以直接通过装置经由大丸剂,或经由连续施用,或经由导管使用连续输注。

[0515] 可以配制包含本文所公开的CAR-EC开关的医药组合物用于吸入,诸如作为干粉。吸入溶液也可以在液化推进剂中配制用于气雾剂递送。在另一种配方中,可以使溶液雾化。用于肺部施用的额外医药组合物包括例如WO 94/20069中所描述的那些,其公开了化学修饰的蛋白质的肺部递送。对于肺部递送,粒度应适合于递送至远端肺。举例来说,粒度可以为1 μ m至5 μ m;然而,举例来说,如果每个粒子是相当多孔的,那么可以使用较大粒子。

[0516] 含有本文所公开的CAR-EC开关的某些配方可以经口施用。以这种方式施用的配方可以在存在或不存在诸如片剂和胶囊的固体剂型的混配中通常使用的那些载剂的情况下配制。举例来说,可以设计胶囊以在胃肠道中在生物利用度最大化并且全身前降解最小化的点处释放配方的活性部分。可以包括额外的试剂以促进选择性粘合剂的吸收。还可以采用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂以及粘合剂。

[0517] 另一种制剂可以涉及有效量的本文所公开的CAR-EC开关,其与适合于制造片剂的无毒赋形剂混合。通过将片剂溶解于无菌水或另一种适当媒剂中,可以制备呈单位剂型的溶液。适合的赋形剂包括(但不限于)惰性稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或粘合剂,诸如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂,诸如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0518] 适合和/或优选的医药配方可以鉴于本公开和配制技术的一般知识来确定,这取决于预期施用途径、递送格式以及所需剂量。与施用方式无关,有效剂量可以根据患者体重、体表面积或器官尺寸来计算。用于确定涉及本文所描述的配方中的每一者的治疗的适当剂量的计算的进一步细化在本领域中常规地进行并且在本领域中常规执行的任务的范围内。适当剂量可以经由使用适当的剂量-反应数据来确认。

[0519] 实施例

[0520] 以下说明性实施例代表本文所描述的应用、系统以及方法的实施方案并且不意欲以任何方式限制。

[0521] 实施例1-位点特异性连接的FITC-抗CD19抗体CAR-T开关平台的CAR-T细胞毒性

[0522] 将抗FITC scFv 4-4-20(4-4-20)、4D5Flu(4D5Flu)、4M5.3(4M5.3)以及FITC-E2(FITC-E2)(表1)亚克隆至含有第二代CAR(从C端起:CD3 ξ 、4-1BB、CD8跨膜域、FITC scFv)的慢病毒载体中。用所得慢病毒载体转导T细胞。

[0523] 表1.FITC抗体

[0524]

scFv	支架	Kd	注释
4-4-20	鼠类	0.23 nM	从小鼠杂交瘤产生, 并且通过构架移植和 易错 DNA 改组而成熟
4D5Flu	嵌合	22 nM	移植至 4D5 的人类构架的 4-4-20 的 CDR
4M5.3	鼠类	0.3 pM	通过易错 DNA 改组诱变的 4-4-20: 极高 亲和力
FITC-E2	人类	0.3 nM	通过噬菌体展示从初始人类 scFv 文库选 择

[0525] 使用非天然氨基酸对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)对抗CD19Fab的位点特异性修饰来完成CAR-T开关的产生。将pAcF并入抗CD19Fab的结合界面远端的两个独立位点(重链, HC K136;或轻链, LC S202, 图2A)处。pAcF的酮然后用作化学把柄以用异双功能叠氮-PEG-氨基连接子(N_3 -TEG-ONH₂)经由肟接合位点特异性地修饰Fab(图2B)。肟接合在生理条件下是高度稳定的。然后经由[3+2]环加成反应将用PEG-环辛炔连接子修饰的FITC“点击”至蛋白质。

[0526] 为了评估可开关CAR-T平台的活性和特异性, 检验用具有四个基于FITC的嵌合抗原受体之一的慢病毒转导的分离的人类效应细胞的细胞毒性(转导效率为40-60%)。CAR-T的细胞溶解活性取决于针对CD19阳性多发性骨髓瘤细胞(IM-9, EC₅₀=3-12pM)和CD19阳性急性成淋巴细胞白血病(ALL)细胞(RS4;11), 而对CD19阴性细胞具有极低活性(K526, EC₅₀未检出)的抗CD19-FITC开关(图3A-B)(表2)。意想不到地, 在这些检验中细胞溶解不依赖于FITC scFv亲和力。这些结果针对CD19阳性伯基特氏淋巴瘤(Daudi)和CD-19阳性IM-9细胞是可再现的。值得注意地, 结果指示经由抗CD19-FITC(平均FITC与抗体比率=2:1)的随机偶联产生的开关相比通过位点特异性偶联至LC S202pAcF、HC K136pAcF或两者形成的开关不太有效(图3C)。另外, 非特异性偶联的开关在1nM或更高的浓度下导致CD19阴性K562细胞的较高背景细胞溶解(相比位点特异性偶联的开关)。非特异性偶联的开关在细胞毒性检验中还展示批次可变性。因此, 位点特异性开关已经在初步结果中展示较高功效和较少脱靶, 从而激励其进一步的研究。

[0527] 细胞毒性检验

[0528] 在不同浓度的FITC“开关”存在下将转导的人类效应细胞(约50%的转导效率)与标靶细胞以10:1(总T细胞与标靶细胞)的比率共同孵育24小时。根据制造商的方案由CytoTox96非放射性细胞毒性检验试剂盒(Promega, Madison, WI)测定标靶细胞的重定向溶解。细胞毒性百分比如下计算: %细胞毒性=(吸光度实验平均值-吸光度自发平均值)/(吸光度最大杀伤平均值-吸光度自发平均值)×100。

[0529] 表2.

[0530]

RS4;11	%细胞毒性			
浓度 (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	4.736842	6.952663	7.608696	15.92837
10	15.89474	20.46351	33.69565	36.19227
100	37.68421	39.00394	53.36439	51.46088
1000	45.05263	51.13412	62.57764	54.38266
10000	43.78947	53.59961	65.68323	55.04241
IM-9	%细胞毒性			
浓度 (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	0	0	16.92913	6.829268
10	43.08943	68.19923	60.62992	65.36585
100	77.64227	73.18008	88.97638	68.78049
1000	69.51219	77.0115	87.00787	86.82927
10000	63.00813	75.09579	79.52756	81.95122
K562	%细胞毒性			
浓度 (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	5.214724	0	0.394866 7	0
10	0	0	1.48075	0

[0531]

100	0.9202454	0	4.047384	0
1000	1.533742	0	0	17.75599
10000	13.59918	30.28105	13.6229	15.35948

[0532] 实施例2-位点特异性连接的FITC-抗Her2抗体CAR-T开关的细胞毒性

[0533] 检验使用基于曲妥珠单抗(赫赛汀(Herceptin))抗体的抗Her2开关对SKBR3 Her2阳性乳腺癌细胞的CAR-T活性。Fab开关以类似于随机偶联的FITC-抗CD19抗体CAR-T开关的方式与FITC随机偶联或在LC S202pAcF处偶联。结果展示与FITC在LCS202pAcF处偶联的这种FITC-抗Her2抗体CAR-T开关有效控制对Her2阳性细胞的活性($EC_{50}=8-20nM$)(图3D,表3)。非特异性偶联的开关在细胞毒性检验中还展示批次可变性。

[0534] 表3.通过偶联方法测得的FITC开关活性

[0535]

SKBR3	%细胞毒性				
浓度 (pM)	aHer2 met叠氮	aHer2 wt NHS (0.5)	aHer2 wt NHS (1)	aHer2 wt iso (0.5)	aHer2 wt iso (1)
0.01	1.973684	0.5695688	1.72117	0.5967605	3.948577
0.1	9.12966	14.533	7.825433	0.0372995	0
1	41.97158	60.69239	24.68021	27.04215	0
10	77.65542	73.0256	60.19564	72.69675	35.50652
100	87.67318	84.06059	78.85629	75.53152	54.46339
1000	95.7016	85.28669	92.85177	89.10854	72.81846
10000	91.08348	87.23404	91.94884	83.28982	74.42327

[0536]

MDA MB231	%细胞毒性				
浓度 (pM)	aHer2 met叠氮	aHer2 wt NHS (0.5)	aHer2 wt NHS (1)	aHer2 wt iso (0.5)	aHer2 wt iso (1)
0.01	0	3.824247	1.72117	0.5967605	3.948577
0.1	0	0	0	0	0
1	0.4157044	0	0	0	0
10	9.745958	0	0.877193	3.500691	0
100	47.99076	34.01163	36.88828	39.88945	20.78413
1000	48.72979	46.89922	46.49123	45.87748	37.12801
10000	45.86605	43.70155	43.53647	41.08706	36.65564
MDA MB468	%细胞毒性				
浓度 (pM)	aHer2 met叠氮	aHer2 wt NHS (0.5)	aHer2 wt NHS (1)	aHer2 wt iso (0.5)	aHer2 wt iso (1)
0.01	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0.6703911	0	0
1	-5.84989	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0

[0537]

100	0	0	0	2.99667	30.60296
1000	0	0	14.07821	36.73696	39.70421
10000	2.538631	8.604651	21.45251	36.29301	40.84187

[0538] 实施例3-对相应的CAR具有不同亲和力的FITC-抗Her2CAR-T开关的功效

[0539] 表达Her2的细胞系已经针对抗原密度充分表征,这反映了临床免疫组织化学表征,其将恶性病分类为0(<20,000个抗原/细胞)、1+(100,000个/细胞)、2+(500,000个/细胞)以及3+(>2,000,000个/细胞)。定量表征的细胞系对于Her2的可用性使其成为理想的系统来研究CAR-T scFv亲和力对抗原密度的影响。建立在展示Her2开关对SKBR3细胞的功效(Her2,3+)的初步数据上,测试各种Her2开关对乳腺癌细胞系MDA MB453(Her2,2+)、MDAMB231(Her2,1+)以及MDA MB468(Her2,阴性,0)的活性。因为对于不可切除的Her2 1+或2+乳癌不存在有效的疗法(曲妥珠单抗仅指定用于3+患者),所以这种CAR-T的临床应用可以呈现对患有不可切除的乳癌的数千女性的显著治疗选项。另外,使用Her2CAR-T细胞的临床试验已经展示这些疗法在高剂量下是潜在有毒的。使用开关滴定开启或关闭CAR-T反应在这种情形中可能特别有利。

[0540] 表4.由靶抗原密度测得的FITC开关活性

[0541]

SKBR3	%细胞毒性			
浓度 (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	4.736842	6.952663	7.608696	15.92837
10	15.89474	20.46351	33.69565	36.19227
100	37.68421	39.00394	53.36439	51.46088

[0542]

1000	45.05263	51.13412	62.57764	54.38266
10000	43.78947	53.59961	65.68323	55.04241
MDA MB231	%细胞毒性			
浓度 (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	0	0	0	0
10	3.395062	8.403806	25.14029	12.71137
100	32.65432	34.93658	55.66779	49.79592
1000	36.97531	47.51586	57.68799	50.37901
10000	30.4321	51.32135	59.48373	57.95918
MDA MB468	%细胞毒性			
浓度 (pM)	4-4-20	4D5Flu	4M5.3	FITC-E2
1	0	0	0	0
10	0	0	0	0
100	0	0	0	0
1000	0	0	0	0
10000	0	0	0	0

[0543] 实施例4. 最佳开关的生物物理特征

[0544] 在伪免疫突触中结构活性关系的透彻理解对于可开关CAR-EC推进至临床候选是关键的。因为位点特异性偶联方法用于形成本文所公开的CAR-EC开关, 所以可以评估以其它方式使用传统的非特异性偶联方法无法探查的开关的生物物理特征(例如, 开关的几何结构、长度、化合价和抗体格式以及其对CAR-EC活化的影响)。

[0545] 虽然当前的两步偶联方法(肟接合继之以点击化学, 图2)对于连接子优化是便利的, 但一步点击偶联对于可规模化生产是需要的。为此目的, 并入非天然氨基酸对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)以充当蛋白原性点击底物用于FITC-连接子(图5A)的一步附接。为了使用这种偶联策略探查开关的尺寸, PEG连接子的长度从4个PEG亚单元(16 Å)变化至32个PEG亚

单元(112 Å)并且评估开关介导细胞毒性的能力。过短的连接子干扰结合,而过度长的连接子通过增加CAR-T与靶细胞之间的距离而降低功效。

[0546] 为了进一步研究位点特异性偶联对可开关CAR-EC的影响,将pAzF并入距原始位点30 Å或更大距离的LC T109或HC A123处并且“转动”开关的几何结构以垂直于免疫突触。另外,这些位点更接近于Fab的抗原结合界面并且应使CAR-T更接近于其靶。在整个Fab中探查额外的突变。

[0547] 通过将pAzF残基同时并入蛋白质中的多个位点处以形成多价底物来测试化合价的作用。初步结果指示2个FITC分子偶联至LC S202和HC K136两者与偶联至一个位点同等有效(图3C)。

[0548] 实施例5. 在异种移植和同基因小鼠模型中并且使用异质性肿瘤评价CAR-T系统

[0549] 在体外优化开关和脱靶反应性之后,在三个小鼠模型中分析CAR-T平台的功效:异种移植、同基因以及异质性(参看图4B中所描绘的流程图)。在体内研究中进行最佳FITC-CAR-T配置。因为开关的血清半衰期可能对体内调控活性的能力具有很大影响,所以首先评价Fab和IgG开关的PK。平衡血清半衰期与安全地滴定开启持久T细胞反应的能力将是重要的。Fab可以是对于CAR-EC的功效和控制理想($t_{1/2}=3-4$ 小时)的抗体格式。用FITC修饰抗体并不预期显著改变PK。通过夹心ELISA和高分辨率质谱法来确认在PK研究中FITC偶联物的完整性。除了静脉内施用以外,还评估皮下生物利用度。

[0550] 异种移植

[0551] 为了评价功效,小鼠异种移植模型用于比较这些可开关平台与先前开发的CAR-T开关平台。为此目的,RS4;11、NALM-6、Raji或其它CD19阳性细胞系用于在非肥胖性糖尿病-重症联合免疫缺陷(NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$, NSG)小鼠中确立肿瘤模型。静脉内(IV)递送FITC-CAR-EC。对于FITC抗CD19开关进行剂量范围的发现,并且与野生型CD19Fab对照相比较。基于肿瘤负荷和总存活期来判断功效。在每周抽取血液下监测小鼠90天以监测外周血中CAR-EC的增殖。CAR-EC的详细免疫表型表征集中于根据标准表型参数使用多通道流式细胞术定义的效应、记忆、衰老(终末分化)或无能表型。这与确定可开关CAR-EC的体内发育是否偏向于特定的T细胞区室特别相关,这种偏向可能影响与CAR-T-19相比的细胞的临床持久性。

[0552] 按照所观测的PK数据以适当剂量递送Fab和基于IgG的开关的功效并且进行比较。IgG在这个模型中由于其在体内的长停留时间而可能最有效。对于这个概念的进一步探查在同基因模型中进行。

[0553] 获得初级源自患者的ALL或CLL样品并且用于在NSG小鼠中产生异种移植模型。通过流式细胞术表征初级样品的CD19表达。在施用疗法之前2-3周在小鼠中确立白血病。通过监测外周血中的CD19⁺ALL胚细胞计数来判断对CAR-T-19的功效。在未控制或消除白血病的情况下,对增殖的胚细胞进行免疫分型(特别寻找CD19抗原表达的丢失,对于进一步研究参看下文)。还监测CAR-EC的持久性(不过后者并不预期与基于RS4;11的异种移植有实质性不同)。

[0554] 同基因

[0555] 测试可开关CAR-EC在有免疫能力的B细胞淋巴瘤小鼠模型中逆转B细胞发育不全的能力。为了形成鼠类替代品CAR-T,将工程改造的基于FITC的嵌合受体克隆至莫洛尼鼠(Moloney murine)基于白血病的逆转录病毒载体用于转导至鼠类脾细胞中。使用源自鼠类

的信号传导域CD28和CD3 ζ 。抗人CD19抗体不与小鼠CD19交叉反应；因此，获得大鼠抗小鼠CD19杂交瘤1D3(来自ATCC)并且对可变区进行测序。将这个序列克隆至表达载体中用于非天然氨基酸并入以形成开关并且克隆至嵌合抗原受体中以形成CAR-T-19小鼠替代品。

[0556] 在体外优化转导和评估功效之后，使用Myc5-CD19细胞系在野生型C57BL/6小鼠中确立B细胞淋巴瘤。基于使用替代品系统的异种移植研究和体外检验以给药时程施用CAR-EC和开关。在这个模型中特别关注的是在Myc5-CD19消失和B细胞剔除的速率上比较Fab和基于IgG的开关。如同异种移植研究一样，监测CAR-T增殖并且离体进行免疫表型表征。在根除淋巴瘤细胞之后，停止开关施用并且监测外周血中B细胞的再增殖。替代品CAR-T-19与替代品可开关CAR-T都预期能够长期缓解，但只有可开关平台能够使B细胞再群体化。在预定义的组群上经由组织学监测CAR-T对主要器官的浸润并且进行细胞分析直至疗法后180天。追踪在不存在刺激的情况下CAR-EC的长期持久性。

[0557] 用于靶向异质性肿瘤的CAR-EC开关

[0558] 第二开关基于抗CD20抗体利妥昔单抗以使用单一过继转移的CAR-T依序或同时靶向相同患者中的不同抗原来对抗在CAR-T-19疗法期间归因于CD19逃逸变体所致的ALL复发。

[0559] 以类似于抗CD19开关的方式使用实施例3中所确定的最佳特征形成抗CD20开关。构建基于利妥昔单抗的CAR-T-20用于比较。体外测试对CD20阳性IM-9和Daudi细胞系的功效。为了形成异质性B细胞成淋巴细胞，使用慢病毒载体用CD19抗原稳定地转导源自慢性骨髓性白血病的K562细胞系(其对于CD20和CD19是阴性的)。经由流式分选获得单细胞克隆体以获得具有均质的CD19表达的群体。然后用CD20转导这个细胞系并且通过高(CD20^{hi})或低(CD20^{low})水平的抗原表达进行分选。使用CD19和CD20开关(同时或依序施用)体外评估可开关CAR-T对CD19⁺CD20⁻与CD19⁺CD20^{hi}或CD19⁺CD20^{low}的混合物的活化和细胞毒性。这种方法提供了研究在群体中用利妥昔单抗开关刺激CAR-T所必需的CD20^{hi}或CD20^{low}细胞的最低百分比的机会。然后在异种移植小鼠模型中测试这个系统。CD19⁺CD20⁻与CD19⁺CD20⁺的混合物用于确立异种移植。或者，如果发现在我们的初始异种移植研究中对于CD19或CD20表达是异质的，那么初级源自患者的ALL样品用于这个实验。施用具有抗CD20开关的可开关CAR-EC以消除CD19⁺CD20⁺群体并且允许CD19⁺CD20⁻细胞外生。为了展示重靶向相同CAR-T的可行性，随后给予抗CD19开关并且监测剩余异种移植物的生长。在处死的小鼠组群中或在初级胚细胞中评价肿瘤的抗原表达。还评估同时靶向。将处理与CAR-T-19、CAR-T-20或两者同时相比较。这种方法可以提供在临床中对抗复发倾向的显著优点，同时避免B细胞的持久损失。

[0560] 实施例6. 小分子开关

[0561] PBMC和细胞系

[0562] 根据制造商的方案通过与Ficoll-Paque PLUS(GE healthcare, Piscataway, NJ)密度梯度介质一起离心从健康供体的全血中新鲜分离人类PBMC。用Dynabeads人类效应活化子CD3/CD28(Life Technologies, Carlsbad, CA)以3:1(小珠与细胞)的比率在含有5%人类AB血清(Valley Biomedical, Winchester, VA)的AIM-V培养基(Life Technologies)中立即活化细胞。使用HEK293FT细胞系进行慢病毒的产生。病毒上清液直接用于在硫酸鱼精蛋白和重组人类IL2(R&D systems, Minneapolis, MN)存在下经由离心接种(spinoculation)

转导活化的PBMC。将C4-2、KB以及A549细胞系分别维持于RPMI-1640、伊格尔氏最小必需培养基(Eagles's Minimum Essential Media)以及补充有10%胎牛血清的F-12K培养基(全部来自Life Technologies)中。

[0563] 图5A示出了P-TriA-FITC的结构。图5B描绘了合成TriA-2-[3-(1,3-二羧丙基)脲基]戊二酸连接子以偶联至FITC的方案。图5C描绘了来自在P-TriA-FITC的连续稀释下靶向C4-2(PSMA+)前列腺癌细胞的抗FITC-CAR T细胞的24小时细胞毒性检验的结果。每种浓度一式三份进行。结果以细胞毒性的平均百分比示出。图5C中描绘的曲线图的数值示于表5中。

[0564]

表 5.						
浓度 (pM)	4M5.3			非转导的 T 细胞		
0.000000	4.662171	4.215603	5.510651	0.176394	0.346090	1.203501
0.000512	3.992319	3.358192	4.688965	1.417854	0.846247	1.051668
0.002560	3.661859	2.491850	2.206047	0.265708	0.846247	0.140669
0.012800	3.554682	1.303979	1.205734	1.632206	0.149600	0.855178
0.064000	2.840173	2.447193	4.572858	0.506855	-0.814990	0.881972
0.320000	2.223909	2.545438	2.965212	0.194257	0.551512	-0.189790
1.600000	4.340642	3.652927	3.956594	-0.341620	0.551512	1.212432
8.000000	9.172509	10.762290	7.582727	1.408922	0.462198	0.551512
40.000000	52.561070	55.812080	53.561380	-1.109720	-0.582770	1.176707
200.000000	77.220560	76.532850	73.915960	-0.529180	0.506855	-0.422010
1000.000000	82.624030	79.944630	78.908590	0.024561	0.096012	0.042424
5000.000000	82.043500	77.452780	78.006520	1.051668	-0.913230	0.113875

[0565] 图6A示出了叶酸盐-FITC的结构。图6B-6C描绘了来自在不同浓度的叶酸盐-FITC存在下与KB(FR+)(参看图6B)或A549(FR-)(参看图6C)靶细胞共同孵育的抗FITC-CAR-T的体外细胞毒性检验的结果。每种浓度一式三份进行。结果以细胞毒性的平均百分比示出。图6B和6C中描绘的曲线图的数值分别示于表6和7中。

[0566] 表6.FR+细胞中FITC-叶酸盐开关的细胞毒性

[0567]

KB	%细胞毒性	
浓度 (pM)	4M5.3	非转导的T细胞
0	5.777075	1.843410667
0.32	8.299503	2.267117
1.6	16.50075	3.005248333
8	37.10323	2.186593667
40	68.10538	2.880628667
200	74.5856	2.324634
1000	77.07735	2.380233333
5000	76.95082	2.042802

[0568] 表7.FR-细胞中FITC-叶酸盐开关的细胞毒性

[0569]

A549	%细胞毒性	
浓度(pM)	4M5.3	非转导的T细胞
0	0.483774	0.212992333
0.32	0.957294667	-0.985726667
1.6	0.526652	-1.021143333
8	0.765276333	-1.052836667
40	2.554960333	-1.51517
200	5.776392333	-0.959626667
1000	5.873333	-1.157236667
5000	3.145929	-1.613976667

[0570] 实施例7.CAR和CAR-T开关构建

[0571] CAR如下构建:

[0572] 设计LV-EF1a-4-4-20-BBZ(SEQ ID NO:1)以靶向异硫氰酸荧光素(FITC)。从小鼠杂交瘤产生具有20nM亲和力的scFv4-4-20,并且通过构架移植或易错DNA改组而成熟。从参考文献Plückthun A.通过环嫁接改善单链Fv抗体片段的体内折叠和稳定性(Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting).《蛋白质工程(Protein Eng.)》1997年8月;10(8):959-66,将其构建成具有轻链继之以重链和(GGGGS)₆(SEQ ID NO.57,其中n=6)连接子。

[0573] 设计LV-EF1a-4D5Flu-BBZ(SEQ ID NO:2)以靶向异硫氰酸荧光素(FITC)。通过将

4-4-20的CDR移植至人源化Her2/neu scFv4D5的构架来产生具有20nM亲和力的scFv 4D5Flu。从参考文献Jung S, Plückthun A.通过环嫁接改善单链Fv抗体片段的体内折叠和稳定性(Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting).《蛋白质工程(Protein Eng.)》1997年8月;10(8):959-66, 将其构建成具有轻链继之以重链和(GGGGS)₆(SEQ ID NO.57, 其中n=6)连接子。

[0574] 设计LV-EF1a-4M5.3-BBZ(SEQ ID NO:3)以靶向异硫氰酸荧光素(FITC)。从通过易错DNA改组诱变的亲本scFv 4-4-20产生具有0.3pM亲和力的scFv 4M5.3。从参考文献Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD.具有单价飞摩尔抗原结合亲和力的抗体片段的定向演化(Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity).《美国科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A.)》2000年9月26日;97(20):10701-5, 将其构建成具有轻链继之以重链和25氨基酸连接子(SSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDG)(SEQ ID NO.58)。

[0575] 设计LV-EF1a-FITC-E2-BBZ(SEQ ID NO:4)以靶向异硫氰酸荧光素(FITC)。通过使用噬菌体展示从初始人类scFv文库选择具有0.3nM亲和力的scFv FITC-E2。从参考文献Vaughan J, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS.从大型非免疫噬菌体展示文库分离的具有亚纳摩尔亲和力的人类抗体(Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library).《自然生物技术(Nat Biotechnol.)》1996年3月;14(3):309-14, 将其构建成具有重链继之以轻链和(GGGGS)₃(SEQ ID NO.57, 其中n=3)连接子。

[0576] CAR-T开关的标靶相互作用域(TID)如下构建:

[0577] pBAD-CD19wt(SEQ ID NO:5)包含靶向在B细胞的表面上发现的小鼠抗人CD19受体和相关恶性病的Fab。通过将小鼠抗人CD19VH和VL域插入人类CH1和CL框架中来构建序列。序列来自Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, Samanta M, Lakhal M, Gloss B, Danet-Desnoyers G, Campana D, Riley JL, Grupp SA, June CH.含有CD137信号转导域的嵌合受体在体内介导增强的T细胞存活和增加的抗白血病功效(Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo).《分子理论(Mol Ther.)》2009年8月;17(8):1453-64。序列来源于抗CD19抗体FMC63。将序列克隆至pBAD载体中。

[0578] pBAD-CD19LS202X mt(SEQ ID NO:6)包含靶向在B细胞的表面上发现的小鼠抗人CD19受体和相关恶性病的Fab。通过将小鼠抗人CD19VH和VL域插入人类CH1和CL框架中来构建序列。在轻链的丝氨酸202中存在一个琥珀突变体位点。琥珀突变体位点允许并入非天然氨基酸。

[0579] pBAD-CD19HK136X mt(SEQ ID NO:7)包含靶向在B细胞的表面上发现的小鼠抗人CD19受体和相关恶性病的Fab。通过将小鼠抗人CD19VH和VL域插入人类CH1和CL框架中来构建序列。在重链的赖氨酸136中存在一个琥珀突变体位点。琥珀突变体位点允许并入非天然氨基酸。

[0580] pBAD-CD19LS202/HK136X mt(SEQ ID NO:8)包含靶向在B细胞的表面上发现的小

鼠抗人CD19受体和相关恶性病的Fab。通过将小鼠抗人CD19VH和VL域插入人类CH1和CL框架中来构建序列。在轻链的丝氨酸202和重链的赖氨酸136中存在两个琥珀突变体位点。琥珀突变体位点允许并入非天然氨基酸。

[0581] 实施例8.FITC- α CS1抗体CAR-T开关的细胞毒性

[0582] 在MM.1S细胞系中检验FITC- α CS1抗体CAR-T开关的细胞毒性。将来自抗CS1克隆体HuLuc63(SEQ ID NO:10或11)的可变区以Fab格式克隆至人类恒定区并且在大肠杆菌细胞中从pBAD载体表达。通过蛋白质G纯化Fab并且使用NHS酯活化的连接子-FITC分子与FITC非特异性地偶联。偶联得到在0.5至1.5的范围内的抗体与FITC比率。为了评估细胞毒性,在不同浓度的偶联抗CS1-FITC开关下以10:1的比率对标靶细胞使用来源于FITC-E2scFv的抗FITC CAR-T。

[0583] 表8.MM.1S(CS1⁺CD19⁻)细胞系中FITC- α CS1抗体开关的细胞毒性

	%细胞毒性	
	α CS1-FITC开关	α CD19-FITC开关
[0584]	浓度 (pM)	
	10	97.29295
	1	81.90135
	0.1	54.43238
	0.01	5.488979
	0.001	1.685213
	0.0001	1.669164
	0.00001	3.715493
		4.996922
		8.273115
		4.841375
		-0.8360615
		-3.69422
		6.05658
		9.459152

[0585] 实施例9.FITC- α BCMA抗体CAR-T开关的细胞毒性

[0586] 在RPMI 8226(BCMA⁺)细胞系中检验FITC- α BCMA抗体CAR-T开关的细胞毒性。将来自抗BCMA克隆体BCMA98(SEQ ID NO:14或15)的可变区以Fab格式克隆至人类恒定区并且在大肠杆菌细胞中从pBAD载体表达。通过蛋白质G纯化Fab并且使用NHS酯活化的连接子-FITC分子与FITC非特异性地偶联。偶联得到在0.5至1.5的范围内的抗体与FITC比率。为了评估细胞毒性,在不同浓度的偶联抗BCMA-FITC开关下以10:1的比率对标靶细胞使用来源于FITC-E2scFv的抗FITC CAR-T。

[0587] 表9.RPMI 8226(BCMA⁺)细胞系中FITC- α BCMA抗体开关的细胞毒性

[0588]

	%细胞毒性
浓度(pM)	α BCMA-FITC开关

10	57.57705
1	48.45045
0.1	24.6988
0.01	0.7577045
0.001	-3.643465
0.0001	-2.776545
0.00001	-1.573434

[0589] 实施例10.FITC-αEGFRvIII抗体CAR-T开关的细胞毒性

[0590] 在U87MG Δ EGFR(EGFRvIII⁺)细胞系和A549(EGFRvIII^{low})细胞系中检验FITC-EGFRvIII抗体开关的细胞毒性。将来自抗EGFRvIII克隆体hu806(SEQ ID NO:12和13)的可变区以Fab格式克隆至人类恒定区并且在大肠杆菌细胞中从pBAD载体表达。通过蛋白质G纯化Fab并且使用NHS酯活化的连接子-FITC分子与FITC非特异性地偶联。偶联得到在0.5至1.5的范围内的抗体与FITC比率。为了评估细胞毒性,在不同浓度的偶联抗EGFRvIII-FITC开关下以10:1的比率对标靶细胞使用来源于FITC-E2scFv的抗FITC CAR-T。

[0591] 表10.U87MG Δ EGFR(EGFRvIII⁺)细胞系和A549(EGFRvIII^{low})细胞系中FITC-EGFRvIII抗体开关的细胞毒性

浓度 (pM)	%细胞毒性	
	A549 (EGFR ^{low})	U87MGΔEGFR (EGFRvIII ⁺)
10	1.6	34.5
1	0.7	31.4
0.1	-0.5	24.1
0.01	-0.1	9.7
0.001	0	1
0.0001	1.2	3
0.00001	1.2	1.5

[0592] 实施例11:优化抗CD19Fab中的FITC偶联位点

[0594] 尽管本文所公开的抗FITC-CAR-T细胞由与常规CAR-T细胞类似的信号传导域组成,但相较于使用常规CAR-T细胞所观测的二元复合物(例如,标靶细胞和CAR-T细胞),可开关CAR-T细胞的活化依赖于三元复合物(例如,标靶细胞、抗体开关以及CAR-T细胞)的形成。因此,研究三元复合物的每种组分以确定通用CAR-EC平台的最佳参数。为了研究偶联位点

的影响,表达若干抗CD19Fab突变体,其中pAzF并入抗CD19Fab的轻链(LC)和重链(HC)上的不同位置处(图9A)。pAzF并入抗CD19Fab的轻链的位置丝氨酸202(LCS202)、甘氨酸68(LCG68)以及苏氨酸109(LCT109)处。pAzF并入抗CD19Fab的重链的位置丝氨酸74(HCS74)、丙氨酸121(HC121)、赖氨酸136(HCK136)处。通过将pAzF并入轻链的丝氨酸202和重链的赖氨酸136(LCS202/HCK136)中并且通过将pAzF并入重链的丝氨酸74和轻链的甘氨酸68(HCS74/LCG68)中还构建双突变体。简单地说,在具有在不同位置处含有TAG密码子的Fab基因的大肠杆菌中共同表达正交琥珀抑制子tRNA和氨酰基-tRNA合成酶(aaRS)对,并且使培养物生长并且将pAzF并入所引入的TAG密码子处。在大肠杆菌的周质溶解之后,通过蛋白质G亲和纯化来纯化Fab。通过SDS-PAGE凝胶和ESI-MS验证Fab中pAzF的分子量和位点特异性并入。然后在单步反应中用环辛炔-FITC连接子位点特异性地修饰在不同位点处含有pAzF的突变体Fab(图9B)。通过尺寸排阻色谱法进一步纯化最终抗体偶联物并且通过SDS-PAGE(图11和图21)和ESI-MS(图10A-N和图22A-H)表征。如图11中所示,泳道1是蛋白质标准,泳道2是LCG68,泳道3是LCT109,泳道4是HCS74,泳道5是HCA121,泳道6是LCS202,泳道7是HCK136,泳道8是LCS202/HCK136,泳道9是空白,并且泳道10是用DTT处理的LCS202/HCK136。如图21中所示,泳道1是蛋白质标准,泳道2是LCS202(无DTT),泳道3是HCS74(无DTT),泳道4是HCS74/LCG68(无DTT),泳道5是WT:DAR~1(无DTT),泳道6是空白,泳道7是LCS202(具有DTT),泳道8是HCS74(具有DTT),泳道9是HCS74/LCG68(具有DTT),并且泳道10是WT:DAR~1(具有DTT)。图10A示出了HCS74的ESI-MS扫描。图10B示出了HCK136的ESI-MS扫描。图10C示出了LCS202/HCK136的ESI-MS扫描。图10D示出了HCA121的ESI-MS扫描。图10E示出了LCG68的ESI-MS扫描。图10F示出了LCS202的ESI-MS扫描。图10G示出了LCT109的ESI-MS扫描。图10H示出了HCS74的去卷积ESI-MS扫描。图10I示出了HCK136的去卷积ESI-MS扫描。图10J示出了LCS202/HCK136的去卷积ESI-MS扫描。图10K示出了HCA121的去卷积ESI-MS扫描。图10L示出了LCG68的去卷积ESI-MS扫描。图10M示出了LCS202的去卷积ESI-MS扫描。图10N示出了LCT109的去卷积ESI-MS扫描。图22A示出了HCS74/LCG68的ESI-MS扫描。图22B示出了野生型抗CD19-FITC DAR~2的ESI-MS扫描。图22C示出了野生型抗CD19-FITC DAR~1的ESI-MS扫描。图22D示出了野生型抗CD19-FITC DAR~0.5的ESI-MS扫描。图22E示出了HCS74/LCG68的去卷积ESI-MS扫描。图22F示出了野生型抗CD19-FITC DAR~2的去卷积ESI-MS扫描。图22G示出了野生型抗CD19-FITC DAR~1的去卷积ESI-MS扫描。图22H示出了野生型抗CD19-FITC DAR~0.5的去卷积ESI-MS扫描。在位点特异性偶联至FITC分子完成后,使用CD19+B细胞白血病细胞系NALM-6作为靶细胞来评价在不同浓度的开关分子存在下抗FITC(FITC-E2) CAR-T细胞的体外细胞溶解活性。简单地说,在各种抗CD19Fab-FITC偶联的开关分子的连续稀释下以5:1的效应子与靶细胞比率共同培养抗FITC-CAR T细胞(FITC-E2)和NALM6(CD19+)细胞。通过流式细胞术测量细胞毒性。如图12以及表11和12中所示,大多数开关分子展示在皮摩尔范围内的强效体外功效。值得注意地,位于抗体的可变区中的两个偶联位点LG68和HS74与其它位置相比展示优良的活性。此外,双偶联物HS74/LG68X抗CD19-FITC开关展示最显著的药效改善,在我们的检验配置中得到亚皮摩尔($EC_{50}=0.07\text{pM}$)活性。因此,这些结果展示确定每个Fab的理想偶联位点在开发最佳开关分子中的重要性。

[0595] 表11. 抗CD19Fab-FITC CAR-T开关和抗FITC-CAR T细胞(FITC-E2)对NALM6(CD19+)细胞的细胞毒性 EC_{50}

[0596]

突变	LG68X	LT109X	HS74X	HA121X	LS202X	HK136X	LS202X/ HS74X	随 机 /DAR-0.5	随 机 /DAR-1	随 机 /DAR-2
EC50 [pM]	3.53	2.823	0.97	3.39	3.80	2.43	2.53	2.60	2.19	1.46

[0597] 表12.各种浓度的抗CD19 Fab-FITC CAR-T开关和抗FITC-CAR T细胞(FITC-E2)对NALM6(CD19+)细胞的细胞毒性

[0598]

浓 度 (pM)	%细胞毒性									
	aCD19-F ITC LG68X	aCD19- FITC LT108 X	aCD19-FI TC HA121X	aCD19-F ITC HA121X	aCD19-F ITC LS202X	aCD19-F ITC HK136X	aCD19-F ITC LS202X/ HK136X	aCD19-FIT C 随 机 DAR (0.5)	aCD19-FI TC 随机 DAR (1.0)	aCD19-FIT C 随 机 DAR (2.0)
0.01	0	0	0	4.40835 3	0.465116	1.50214 6	0	0	0	4.98576
0.1	3.84615 4	7.53715 5	21.42857	0	8.13953 5	0	14.9473 7	24.18953	0	0
1	17.7884 6	17.1974 6	47.55102	18.7935 1	25.5814	25.1073	26.9473 7	24.93766	23.0137	31.9088
10	56.7307 7	66.6666 7	74.69388	64.0371 3	60.2325 6	69.9570 9	60	67.0823	53.1507	60.9687
100	78.125	76.2208 1	89.59184	78.4222 7	83.9534 9	86.2661	76.6315 8	71.82045	72.0548	69.5158
1000	74.5192 3	77.9193 2	92.85715	84.4547 6	87.6744 2	86.0515 1	77.0526 3	81.79551	66.5754	74.9289

[0599] 实施例12.FITC-CART和P-TriA-FITC的体内功效

[0600] 小鼠中靶向PSMA的小分子开关P-TriA-FITC的药物动力学(PK)研究揭示这种化合物具有适度的静脉内(IV)半衰期($t_{1/2}=1.08\pm0.14$ 小时)。简单地说,在非肥胖性糖尿病-重症联合免疫缺陷(NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$, NSG)小鼠中确立皮下C4-2(PSMA+)肿瘤。在可触摸的肿瘤(肿瘤的长度或宽度 $>200\text{mm}^3$)形成后,通过腹膜内注射过继转移FITC-CART细胞(FITC-E2)并且连续10天静脉内施用1mg/kg日剂量的P-TriA-FITC。在开关处理完成后,肿瘤在已经接受FITC-CART细胞和P-TriA-FITC的小鼠中已经消退,而肿瘤生长在仅接受CART细胞或开关或者CART细胞与日剂量的媒剂(PBS)的小鼠中继续,参看图13。这种体内功效研究指示与P-TriA-FITC开关组合的FITC-CART细胞在靶向PSMA阳性肿瘤中高度有效。额外的研究可以涉及表征和优化以展示可开关CAR-T细胞的体内剂量可滴定性。

[0601] 实施例13.抗FITC CAR-EC和FITC-抗CD19开关在治疗B细胞淋巴瘤中的评价

[0602] 目的:这项研究评价包含表达嵌合抗原受体(CAR)和开关的效应细胞的嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)在治疗B细胞淋巴瘤中的功效和安全性。CAR包含有包含抗FITC scFv的外区。开关包含有包含FITC的嵌合抗原受体相互作用域(CAR-ID)和包含抗CD19scFv的标靶相互作用域。

[0603]

病状	干预	期数
B 细胞淋巴瘤	遗传学: 抗 FITC CAR T 细胞和 FITC-抗 CD19 scFv 开关	I 期、II 期

[0604] 研究类型: 干预

[0605] 研究设计: 终点分类: 安全性/功效研究

[0606] 干预模型: 单组分配

[0607] 掩蔽: 开放标签

[0608] 主要目的: 治疗

[0609] 主要结果测量:

[0610] 具有不良事件的患者数。[时间帧: 2年][指定为安全问题: 是]

[0611] 使用不良影响的常用毒性标准(CTCAE)4.0版确定CAR T细胞的毒性型态。

[0612] 次要结果测量:

[0613] 体内抗FITC CAR T细胞的存活时间。[时间帧: 2年][指定为安全问题: 否]测量用抗FITC慢病毒载体转导的CAR T细胞的存活。

[0614] 对CAR T细胞的反应率。[时间帧: 2年][指定为安全问题: 否]描述用第4代CAR T细胞处理的患者的反应率, 包括部分缓解(PR)、完全缓解(CR)、稳定疾病(SD)以及进行性疾病(PD)。

[0615] 患者的存活时间。[时间帧: 2年][指定为安全问题: 否]评价用第4代CAR T细胞处理的患者的存活时间, 包括无进展存活期(PFS)和总存活期(OS)。

[0616]

估计录入:	20
研究开始日期:	TBD
估计研究完成日期:	TBD
估计主要完成日期:	TBD (主要结果测量的最终数据收集日期)

	臂	分配的干预
[0617]	实验: CAR T 细胞 自体抗 FITC CAR T 细胞	遗传学: 抗 FITC CAR T 细胞 自体第 4 代可抽出的慢病毒转导的 抗 FITC CAR T 细胞

[0618] 详细描述:

[0619] 基于CD19单链抗体的嵌合抗原受体(CAR)工程改造的T细胞在治疗慢性和急性B细胞白血病中已经展示巨大的临床潜力。B细胞淋巴瘤,类似于B细胞白血病,表达CD19表面分子,并且大多数B细胞淋巴瘤患者无法被标准化学放射疗法治愈。基于CD19CAR的过继T细胞疗法与不当的不良影响,即CD19B细胞的损失相关联,这导致体液免疫缺陷。这项研究将评价新颖的抗FITC CAR-T细胞和FITC-抗CD19scFv开关在淋巴瘤患者中的功效与安全性。将密切监测接受抗FITC CAR-T细胞和FITC-抗CD19scFv开关的患者的输注反应、肿瘤根除效果、CAR T细胞的寿命以及在抽出CAR T细胞和/或FITC-抗CD19scFv开关之后B细胞功能的恢复。

[0620] 资格

[0621]	有研究资格的年龄:	18 岁和更大年龄
[0622]	有研究资格的性别:	都可
	接收健康志愿者:	否

[0623] 标准

[0624] 纳入标准:

[0625] ●通过免疫组织化学(IHC)或流式细胞术证明的复发性或难治性CD19(+)B细胞淋巴瘤患者。

[0626] ●在ASCT之后不符合自体干细胞移植(ASCT)的资格或复发。

[0627] ●0-2的东部肿瘤协作组(ECOG)体能状态。

[0628] ●年龄 ≥ 18 。

[0629] ●在室内空气中脉搏血氧饱和度 $>90\%$ 。

[0630] ●足够的肝功能,定义为丙氨酸转氨酶(ALT) $<3 \times$ 正常值上限(ULN),天冬氨酸氨基转移酶(AST) $<3 \times$ ULN,血清胆红素和碱性磷酸酶 $<2 \times$ ULN。

[0631] ●足够的肾功能,定义为血清肌酐 $<2.0\text{mg/dl}$ 。

[0632] ●足够的心脏功能,其中LVEF $\geq 50\%$ 。

[0633] ●Hb $\geq 80\text{g/L}$ 。

[0634] ●可以鉴别到可测量的疾病。

[0635] ●预期寿命 ≥ 3 个月。

[0636] 性活跃患者必须愿意在研究期间并且在研究结束之后持续1年利用更有效的避孕方法之一。男性伴侣应使用避孕套。

[0637] ●患者必须签署知情同意书。

[0638] 排除标准：

[0639] ●不受控的活动性感染。

[0640] 具有B型肝炎病毒(HBV)、C型肝炎病毒(HCV)的活动性感染。

[0641] ●HIV阳性。

[0642] 怀孕或哺乳。

[0643] ●当前录入另一个临床试验中。

[0644] 同时使用全身类固醇。

[0645] 虽然本文已经示出和描述本发明的优选实施方案,但本领域的技术人员将显而易见,这类实施方案仅作为实例而提供。在不脱离本发明的情况下众多变更、变化以及取代现在将为本领域的技术人员所想到。应了解,在实施本发明中可以采用本文所描述的本发明实施方案的各种替代物。

表13. CAR-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
LV-EF1a-4-4-20-BZ	1	cagggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttggttattttctaaatcaattcaaatagtatccgctcatga gacaataaccctgataaattgcttcaataaattgaaaagggaagagatgagtagtattcaacatttccgtgctgcccttattcc cttttttgcggcattttgcctctctgttttgcctcaccagaaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtg cacgagtggtgtacatcgaaatggaatcgaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgttttccaatg atgagcactttaaagttctgtatgtggcgggtatlatcccgatltgacggcgggcaagagcaacacggcgcgcgcal acactattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaat tatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactcggccaacttactctgacaacgacgagggaccggaaggagc taaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacca aacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaactacttact ctagcttcccgcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccactctgcgctcggcccttccgg ctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcatgtgacactggggccagatggt aagccctcccgatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgtgag ataggtgctcactgatlaagcattgglaactgacagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttatttta atttaaaaggatctagggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtc agaccccgtagaaaagatcaaaaggatctcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgctgcaaaaaaaaacc accgctaccagcgggtggtttgtttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactgcttcagcagagcgc agataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttagggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcg ctctgctaatectgttaccagtggtcgtgctgccaatggcgataagtcgtgtctaccgggttgagctcaagacgatagttac cggataaggcgcagcggctcgggtgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttgaggcgaacgacctacacgg aactgagatacctacagcgtgagclatgagaagcggcacgcttccgaaggagaaaggcggacaggtatccggt aagcggcagggctcggaaacaggagagcgcagagggagcttcagggggaaacgcctggtatctttatagctctgtc gggttgcgccacctctgacttgagcgtcgaattttgtgatgctcgtcaggggggcgagcctatgaaaaacgccagca acggcgcccttttacgggtccttgccctttgtgacctttgtcacaatgttcttctcgttatccctgattctgtgataa ccgtattacgcctttgagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgag gaagcgggaagagcgcccaatlacgaaaccgctctccccgcgcttgccgattcattaatgcagctggcagcaca ggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcacattaggcaccacaggcctt acacttlatgcttccggcctgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcaacaggaacagctatgacatgat lacgccaagcggcgaattaaccttcaclaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttlaattgagtcttattgcaatct ctttagtcttgcaacatggtaacgatgagtttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattg gtggaagtaagggtgtagcatcgtgcttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaa ttgccgcatgacagatatattgatttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctgtttagaccagatctgagcc tgggagctctctggctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcagtagtgtgtgcc cgtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaataatctctagcagtgggcggccga

[0646]

表13. CAR-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
		acagggacctgaaagcgaaaggaaaccagagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgacggcga gaggcgagggggcgcgactggtaglacgcaaaaattlgaclagcggaggctagaaggagagatgggtgcg agagcgicagllaaagcggggagaallagaicgcgalgggaaaaaalcggllaaggccaggggaaagaaaaa atataaattaaacatatagtatgggcaagcaggggagctagaacgattcgcagitaatcctggcctgttagaacatcag aaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataataca gtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaaggatagataaaagacaccaaggaaagctttagacaagatagaggagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggcgctgattctcagacctggaggaggagatagaggacaat tggagaagtgaattatataataataaagttagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaaga gtgtgtcagagagaaaaagagcagtggaataggagctttgttcttgggttcttgggagcagcagggaagcactatg ggcgagcccaatgacgclgacggtagcagccagacaallatlgctggtagtagcagcagcagaacaalltgctga gggtatgtaggcgcaacagcaictgttgcaactcacagctctgggcatcaagcagctccaggcaagaatctcgctg tggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggtttgggttgccttggaaaactcatttgcaccactgctgtgctt ggaatgctagtggagtaataatctctggaacagattggaatcacagaccctggatggagtgaggacagagaaattaa caattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaat tagataaatgggcaagtttgggaattgtttaacatacaaaattggctgtggtatataaaattattcataatagatagga ggcttggtaggttaagaatagttttgtgacttctatagtagataggttagcaggatattaccattatctgttcag accacctcccaacccgaggggacccgacaggcccgaaaggatagaagaagggtggagagagagacagag acagatccattcagtagtagacggtatcgcagggtaactttaaaagaaaaggggggttgggggtacagtgacg gggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattacaaaaaataacaaaaattcaaaattt atcagactttgcaaaagtgataaagtttaaacagagaggaaatctttgcagctaattggacctttaggtcttgaaggag tgcctgtgaggtccggtgcccgcagtgggcagagcgacatcggccacagtcggcgagaagttggggggagg ggtcggcaattgaaccgggtgcttagagaagggtggcggggtaaactgggaaagtatgtctgtactgtgctccgc ttttcccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcggcgtaacgttcttttgcacgggttgcggc agaacacaggtaagtccgtgtgtgttcccgcggcctggcctctttacgggttatggccttgcgtgcttgaattac ttccacclggctcaglacgtagtcttgalcccagcttgggttggaaagtggttgggagagtgaggcccttgcgctt aaggagccccttcgcctctgtgtgtgtgagtgaggcctggcctggcgctggggcccgcgctgcgaattctgtggcac ctctgcgcctgtctgctgttctgataagtctctagccatttaaaattttgatgacctgtctgcgacgtttttctgcaag atagcttgaatgcgggccaagatctgcacactgtgtatctgggttttggggccgcccggcgacggggcccggtg cgtcccagcgacatgttcggcgaggcggggctgcgagcgcgccaccgagaatcgacgggggtatgtctcaag ctggccggcctgtctgtgtgctgtgctgcgcgcgctgtatgccccgcccgtggcgcaaggctggcccgtct ggacacagttgctgtgagcggaaagatggcgttcccggcctgtgcaggggagctcaaaatggagacgcggcg ctggggagagcggcggggtgagtcacccacacaaaggaaaaggccttccgtcctcagccgtcgtctcagtgact ccacggagtagcggcgccgtccaggcacctcgattgtctcagcgttggagtagctgtctllagggtgggggga ggggtttatgcgatggagttcccaactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctc ctggaaatttgcctttttgagtttgatcttgggtcaatcagccctcagacagtggttcaaaattttttctccattcaggt gtctgagggaattcgggtaccgcccggccggggtatccatggccttaccagtgaccgcttctctgctgctgctgct tgcctctccacgcgccaggccggatgtgtatgaccagaccccgctgctctgcccgttccctgggtgaccaggc gagtatctctgctgtctctcagtcctgtgtcacagtcagggtaacacctatctgctgtgtatctgcaaaaaccagg ccagagccctaaggtgctgattataaggttcaaatcggttttagcggcgctcccgatcgcttctctgggagtgatcag ggaccgacttllacactgaaaallagccgclggaagcagaggatctggcggtgacttllgagccagtcaccatcatgt gccgtggacctcggcggtgggacaaaactggaaattaagcgtgcaggaggcgggtgggagcggagcggtgggtc cggagcggtgggtctggaggcggtggagtgaggcggtgggtcaggcggtgggtgggagcgaagtgaactgg

[0647]

表13. CAR-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
		aactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcacgctccgaaggagagaaaggcgacaggtatccggt aagcggcagggcgcgaacaggagagcgcacgagggagctccaggggggaacgcctgglatctllatagctctgic gggttctgcacclctgactlgagcgtcgalitlgtgaltcgtcagggggggcgagcctatggaaaaagccagca acgcggccttttacgggtcctggcctttgtggtcctttgtcactgtcttctcgttatccccgattctgtgataa ccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggccagccgaaccagccagcgagcagcagtgtagcgag gaagcggagagcgcccaatacgaaccgcctcctcccgcgcttggccgattcattaatcagctggcagcaca ggtttccgactggaaagcgggcagtgagcgcaaccgaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccacagcctt acactttatgctccggctcgtatgtgtgtggaatgtgagcggataacaattcacacaggaacagctatgacatgat tacgccaagcgcgaattaacctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaagtgtcttatgcaatact cltgtagcttgcacatggtaacgatgagttagcaacatgcctllacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgallg gtggaagtaagggtgtacgatcgtgcttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaa ttgccgcatlgcagagatattgtattaaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggtagaccagatctgagcc tgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagctgctttagtgcttcaagtgtgtgccc cgtctgtgtgtgactcggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtgcgccccga acagggacctgaaagcgaagggaacccagagctctcgcacgcagcagcctggcttctgtaagcgcgcacggcaa gagggcagggggcgactgggtgagtgacgcaaaaattttgactagcggagggctagaaggagagatgggtgctg agagcgtcaglatlaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaaltcggglaaggccagggggaaagaaaaa atataaaltaaaacatagatagtgaggcaagcagggagctagaacgaltcgcaglatatcctggcctgtlagaacalcag aaggctgtagacaaactgggacagctacaacctccctcagacaggaatcagaagaacttagatcattatataataca gtagcaacctctattgtgtgcatcaaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatagaggacaat tggagaagtgaattataataataaagttagtaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaaga gtgggtcagagagaaaaagagcagtgaggataggagctttgttctctgggttcttgggagcagcaggaagcactatg ggcgagcctcaatgacgctgacgggtacagccagacaattattgtctggtatagtgacgagcagaacaatttctga gggctaltgagcgcaacagcatctgttgcacalcacagctcggggcalcaagcagctccaggcagaalcttggctg tggaaagatacctaaggaatcaacagctcctggggatttggggtgctctggaaaactcattgcaccactgctgtgctt ggaaatgctagttggagtaataatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgaggacagagaaatta caattacacaagcttaatacactcctaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaat tagataaatgggcaagtttgtggaattgggttaacatacaaatggctgtgtgtatataaaattatcataatgtagtagga ggcttggtaggtttaagaatagttttgtctgtacttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccattatcgttcag accacctcccaaccccgaggggacccgacagggccgaaggatagaagaagaagggtggagagagagacagag acagatccaltcgallagtgaacggaltcgcaggttaactlfaaaagaaaaggggggaltggggggtacagtgcag gggaagaalagtagacalaatagcaacagacatacaaaactaaagaaltacaaaaaacaaltacaaaaaltcaaaatll atcgagctttgcaaaagatggataaagtttaacagagaggaatctttgcagctaatggaccttctaggtcttgaaggag tgctcgtgaggtcctgggtgccgtcagtgggcagagcgcacatcgccacagtcgccgagaagtggggggagg ggctggcaattgaaccggtgcttagagaagggtggcggggtaaacgggaaagtgtgtgtactggtcctccgcc ttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtcagtagtcgccgtgaacgttcttttgcgaacgggttgcgcc agaacacaggtgaagtgcctgtgtgtgttcccgccgctggcctcttacgggttatggccttgcgtgcttgaattac ttccacctggctgcagtagtgattcttgatcccgagcttcgggttgaagtgggtgggagagttcaggccttgcgtt aaggagccccctcgcctcgtcgtlgtgagtgagcctggcctggggcgctggggccgcccgtlccgaatcgtggcac cttcgcgctgtctcgtcgttctgataagtcctagccattaaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggaag atagcttgtaaatgcggccaagatctgcacactggtatttcgggtttggggccgcccggcgacggggcccgctg

[0652]

表13. CAR-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
		acagggacctgaaagcgaaagggaaccagagctctcgcacgcaggactcggcttgctgaagcgcgacggcga gaggcgagggggcgacgtggtgaglacgcaaaaattltagclagcggaggctagaaggagagatgggtgcg agagcgicaglallaagcgggggagaallagaicgcgalgggaaaaaattcggllaagccagggggaaagaaaaa atataaattaaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgcagitaatcctggcctgttagaacaatcag aaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccateccctcagacaggaatcagaagaacttagatcattataataca gtagcaaccctctattgtgtcatcaaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatagaggacaat tggagaagtgaattataataataaagttagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaaga gtggtgcagagagaaaaagagcagtggaataggagctttgttcttgggttcttgggagcagcagggaagcactatg ggccgcagcccaatgacgclgacgggtacaggccagacaallatlgcltgglatagtgacgcagcagaacaalltgcga gggtctattgagcgcaacagcaictgttgcaactcacagctctgggcatcaagcagctccaggcaagaatctcgctg tggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggtattgggttgccttggaaaactcatttgcaccactgctgtgectt ggaaatgctagtggagtaataatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaa caattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaat tagataaatgggcaagtttgggaattgttgaacataacaaattggctgttggtatataaaattattcataatgatagtagga ggcttggtaggttaagaatagtttctgtacttctatagtgaaatagtgtaggagcaggtatcaccattatcgtttcag accacctcccaaccccgaggggacccgcagggcccgaaaggaaagaagaaggltggagagagagacagag acagatccattcgtalltagaacggatcgcacgggttaactttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgacg gggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattacaaaaaattacaaaaattcaaaattt atcgagctttgcaaaagtgataaagtttaaacagagaggaaatcttgcagctaattggacctttaggtcttgaaggag tgcctCGTGAGGCTCCGGTGGCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCAC AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTA GAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCT CCGCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTC GCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAA GTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCT TCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTA AGGAGCCCCCTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTT TCGATAAGTCTCTAGCCATTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTT TTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGT ATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGC GCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCG GACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGC GCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCA CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGG AGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCA CCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTG ACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG CTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGG AGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCA

[0655]

表13. CAR-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
		CTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGATCTTGGTT CATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGG TGTCGTGAaggaaileggilacceggecgceggggatceatggcettaccaglgaccgectgctcctgecge tggccttgctgctccacgcecgagggcgCAGGTTTCAGCTGGTTGAGAGCGGAGGCAAT CTGGTTTCAGCCCGGTGGTAGTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCGTCAGGGT TCACTTTCGGTAGTTTTTCAATGAGCTGGGTCCGTACAGGCACCAGGCGG TGGGCTGGAATGGGTGGCAGGTCTGTCTGCACGTAGCTCCCTGACCCAC TATGCAGATAGTGTTAAAGGGCGGTTACAATTTACGCGACAACGCTA AGAATAGCGTCTACCTGCAAATGAACTCCCTGCGGGTTCGAGGATAACCGC AGTGTATTACTGCGCTCGCCGTTCTTATGACTCTAGTGGATACTGGGGCC ATTTTTATAGCTACATGGATGTGTGGGGACAGGGCACTCTGGTGACCGTT TCCGGAGGCGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGGAGTGAGGCGGTGGGTCA AGCGTTCTGACCCAGCCGTCCTCTGTCAGCGCCGCGCCAGGCCAGAAA GTGACAATTTCTGTCTGGAAGTACTTCAAACATCGGCAACAATTATGT TTCCTGGTATCAGCAGCACCCGGGCAAAGCGCCCAAGCTGATGATTATG ATGTGTCTAAACGTCCAAGTGGTGTTCCTGACCGGTTACGCGGTTCCAA GTCTGGGAATAGTGCCTCACTGGACATCTCAGGCCTGCAAAGCGAAGAT GAGGCGGACTATTACTGCGCAGCTTGGGATGACAGCCTGTCCGAATTTCT GTTCGGCACCGGGACAAAGCTGACCGTGCTGGGCaccacgacgcccagcgccgga ccaccaacaccggcgcccaccatcgctcgagccccgtccctgcgcccagggcgctccggccagcgccggg ggggcgagtgacacgagggggctggactcgcctgtgatactacatctggggccccctggccgggacttgggg tcttctctctgctactggtatcaccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaccattatg agaccagtacaaactactcaagagggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaagaggagatgtgaact gagagtgaaagtcagcaggagcgacgacgcccccggtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaat claggacgaagagaggagtagatgtttlggacaagagacgtggccgggaccclgagatggggggaagccgaga aggagaaccctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggcctacagtgagattggga tgaaaggcgagcgccggagggggaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacct acgacgcccctacatgcaggccctgccccctcgtaagtcgacaataacctctggattacaaaatttgtaagattg actggtattcttaactatgttctctctttacgctatgtggatacgctgctttaatgaccttgatcatgctattgcttccgtag gcttcatittctctccttgataaatcctgggtgtgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcggtg gtgtgcactgtgtgtgtgacgaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggactttcgt tlccccctccctallgccacggcggaactcagccgctgcttggccgctgctggacaggggctcggtgtlgggc actgacaallcgtggtgtgtcgggggaagctgacgltccttccatggcgtcgtcgtgtgtgccacctggaltcgtgc gggacgtccttctgtaegteccctggccctcaatccagcgacgttcttcccgccgctgctccggctctgccc ctcttccgctcttgccttgcctcagacgagtcggatctccttgggcccgtcccccgctggaattcgagctcgg tacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagggggactggaaggctta attcaactcccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctctggtagaccagatctgagccgtggagctct ctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgctcaagtagtgtgtgccgctgtgtgt gtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaatctctagcagtagtagttcatgtcattatt attcaglatlataacttgcaaaagaalgaatatcagagagtgaagggaactlgtlaltgcagcttataatggtlacaata aagcaatagcatcacaaittcacaaataaagcaatttttctactgactttagttgtgtgtccaaactcatcaatgtatct tatcatgtctgctctagctatccgcccctaactcgcgccagttccgccattctccgcccattgctgactaatttttta

[0656]

表13. CAR-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
[0657]		ttatgagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggccttt tgcgtcgagacgtaccgaattcgcctatagtgagtcgtattacgcgcctcactggcgtcgtttacaacgtcgtgact gggaaaaccttgccgttaccgaacttaacgccttgacgacatcccccttcgcagctggcgttaatagcgaagg cccgcaccgatgccttcccaacagtggcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgccctgtagcggcgcatta agcgcggcgggtggtggtgtacgcgcagcgtgacgcgtacactggcagcgccttagcgcgccctccttgccttct tcccttcttctgccacgttcgcggccttccccgtcaagctctaatacggggcctcccttaggggttccgattagtgct ttacggcaccctgacccccaaaaacttgattaggggatgggtacgtatgggcccacgcctgalagacgggtttcgc cctttgacgttgagtcacgttcttaatagtggactctgttccaaactggaacaacactaacctatctcggtctatt cttttgattataaggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaattaacgcgaatttaa caaaatattaacgtttacaatttc

表14. CAR-EC开关靶靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
pBAD-C D19wt	5	aagaaaccaattgtccatattgcatcagacattgccgtcactgcgtctttactggctcttctcgtaaccaaaccggtaac cctgattattgcacggagtcacacttgatgcatagcattttatccataagattagcggatcctacgtacgcttttat cgaactcttactgtttctccatacccggtttttggcctagaaataattttttaactttaagaaggagaatacatcaacta gtacgcaagtcacgtaaaaagggtatctagaggttgaggtgattttgaaaaagaatacgcatttcttctgtagcat gttcgtttttctatgtctacaaacgcatacgtgacatccagatgacacagactacatcctcctgtctgcctctctggga gacagagtcacatcagttgcaggcgaagtcaggacattaglaaattttaaatggtafcagcagaacccagatggaa ctgtlaaacctcctgatcaccalacalcaagattacactcaggagtcacatcaagggttcagtggtcgtctggaaaca gattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttccaacagggtatatacgtctccgtaca cgttcggaggggggaccaaagcttgagatcaaacgaactgtggtcgtcaccatctgtcttcatcttccgccatctgatga gcagttgaaacttgaaactgcctctgtcgtgtgcctgctgaataaactctatccagagagggccaaagtacagtggaag gtggataacgcccctcaatcgggttaactccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcaactacagcc tcagcagcaccctgacgtcagcgaagcagactacgagaaacacaaagctacgcctgcgaagtcaccatcagggg cctgtctcgcggcgcacaaagagcttcaacaggggagagtgtaagcctggggaacctctagagggtgaggtgatttat gaaaaagaataatgcatttctctgcatctatgttctgttttctatgtctacaaacgcgtacgctgaggtgaaactgcagg agtcaggacctggcctggtggcgcctcagagagcctgtccgtcactgactgtctcagggtctcattaccgacta tgggtgaagctggattcggcagcctccacgaagggtctggagtggtgggagtaataagggttagtgaaaccacata ctataatcagcttcaaatccagactgacctatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctt gcaactgatgacacagccatttactactgtgccaacatttactacggtggtagctatgctatggactactggggcca aggaaactcagtcaccgtctcctcagcctccaccaaggggccatcgtcttccccctggcaccctctccaagagcac ctctgggggcacagcggcctgggctgctgtgcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcag gcgcccgtaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtga ctgtgcccctagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggac aagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacataataagtcgaccgatccccttgagagccttcaaccaggt cagctccttccgggtggcgcgggcatgactatctgcgcgcactatgactgtcttcttcatcatgcaactcgtaggaca ggtgccaaacggctcagcttggcgtgtttggcggtatgagagaagatttccagcctgalacagattaaatcagaacgca gaagcggctgataaaaacagaatttgcctggcggtcagtagcgggtgggtccaccctgaccccatgccgaactcagaa gtgaaacgccgtagcgcggtggtggtgtgggtctccccatgcgagagtagggaactgccagcatcaataaaac gaaaggctcagtcgaaagactggccttctgtttatctgtgtgtcgtggaacgctcctcagtagtaggacaaaaccgc

表14. CAR-EC开关靶靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
		cgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccgagggtggcggcaggacgcccgcataaactgccagg catcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgtttctacaaactcttttgtttattttctaaatacatca aatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgtctcaataatattgaaaaaggagatgagtgattcaacatt tcggtgtcgccttattccctttttgcggcattttgccttcctgttttgcacccagaaaacgctggtgaaagttaaagatg ctgaaagatcagttgggtgcacgagtggtgtacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcgcc gaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgtatgtggcgcggtattatccgtgttgacgcccgggcaagag caactcggcgcgcacalacactlctcagaatgactlggltgagtlactaccagtcacagaaaagcatcttacggatgg catgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttactctgacaacgatcg gaggaccgaaggagctaacctgttttgcacaacatggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagct gaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatcctgtagcaatggcaaacggttcgcaaaactatfaa ctggcgaaactacttactltagcttcccgcaacaatlaaactgtagtgaggcgcgataaagtgcaggaccacttctg cgtcgcgccttccggctgctgtgtttattgtctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcgttatcattgcagc actggggccagatggtlaagccctcccgtatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggtgaacgaaa tagacagatcgtgagatagggtgccactgattaagcatlgttaactgtcagaccaagtlilactatatalactltagattg attlaaaactlcaflitlaaallaaaggatclaggtagaagatcctllilgataatctcatgacaaaalcccllaacgtgagtl tcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgctt gcaaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgtttgtttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactg gcttcagcagagcgcagataccaataactgtcttctagttagccgtagttagccaccacttcaagaactctgtagca ccgctacatacctcgtctgtactatcctgttaccagtggtgctgctgccagtgggcgataagtgtgtcttaccgggttgac tcaagacgatatgtaccgataagcgcgacggctgggtgaaacgggggttctgtgcacacagcccagcttggagc gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggccacgcttcccgaaggagaaaggc ggacagglatccggtaagcggcaggggtcggaaacgagagcgcacgaggagcclccagggggaaacgcctgg atctttatagtcctgtcgggttccgcaacctgacttgagcgtcgtatgttgtgatgtcgtcagggggggcggagcctatg gaaaaacgccagcaacggcgcctttttacgggttctgaccttttgccttctgctgaccttttgcacatgttcttctgcgttatccc ctgattctgtggataaccgtattaccgctttagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcg agtacgtgagcggaggagcgggaagagcgcctgatgcggatatttctccttactgcacatctgtgcgggtatttcaaccgcata tgggtgactctcagtaaatctgctctgafccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgtacgtgacttgggtca tggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgcccgtgacgggctgtctgtctcccgatccgcttacaga caagctgtgaccgtlccgggagctgcatgtgtcagagggtlccaccgtacacccgaacgcgcgagggcagcagatc aatlcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcataalgtgcctgtcaaatggacgaagcagggtatctgcaaacctatg ctactcgtcaagccgtcaattgtctgattcgttaccatattgacaacttgacggctacatcattcatttttcttcaaac ggcacggaactgctcgggtggtgccccggtgcattttttaataaccgcgagaaaatagattgatcgtcaaaaaccaac attgcgaccgacgggtggcgataggcatccgggtggtgtcaaaagcagcttccgtggcgatagcttggctcgcg ccagcttaagacgctaalccttaactgctggcgaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacatgctgtg cgacgctggcgatataaaattgctgtctgccaggtgatcgtgtgactgacaaagcctcgcgtacccgattatccate ggtggatggagcactcgttaactgcttccatgcgccgagtaacaattgctcaagcagatttatgccagcagctccg aatagcgccttccctlcccgcggtltaalgatttgcacaaacaggcgcgtgaatcggtgtggtcgtlccatccgg gggaaagaaccccgtaattggcaaatattgacggccagtaagccattcatgagtaggcgcgcggacgaaagttaa cccactggtgataccattcgcgagcctccggatgacgaccgtatgtatgaatctctctggcgggaacagcaaaat caccggctgggcaaacaaattctcgtccctgattttcaccacccctgaccggaatgtgagattgagaataaacctt tcattccagcggctggctgataaaaaatcgagataaccgttggcctcaatcgcggttaaacccgccacagatggg cattaaacgagatcccggcagcaggggatcttttgcgttcagccatactttcactccgccattcagag

[0659]

表14. CAR-EC开关靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
pBAD-C D19 LS202X mt	6	aagaaaccaatgtccatattgcatcagacattgccgtcactgcgtcttttactggetcttctcgtacccaaccggtaac cctgatllatlgcacggagtcacactllgctatgccaalagcattllalccataagattlagcggatcctacctgacgcctlltal cgcaactctctactgttttccatacccggtlllllgggctagaaaalattllgllaaactllaaagaaggagaatacatcaacta gtacgcgaaggtcacgtaaaaaggggtatctagagggttgagggtgattttatgaaaaagaatatcgacatttcttctgtagcat gttcgtttttctattgtctaaaaacgcatacgcctgacatccagatgacacagactacatctctccctgtctgcctctctgaggga gacagagtcacccatcagttgcaggggcaagtcaggacattagttaatatattaaattggtatcagcagaacacagatggaa ctgttaaactcctgatctacatacatcaagattacactcaggagtcctcatcaagggticagctgggcagttgggtctggaaca gattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttactttggccaacagggtlaatacgtctccgttaca cgttcggagggggggaccgaagcttgagatcaaacgaactgtggtctgcacatctgtcttcatcttccggccatctgatga gcagllgaaatcgggaactgccctctgctgctgctgctgaalaactllctalccagagaggccaaaglacagtgggaag gtggataacgccctccaatcggtgtaactccaggaggtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcc tcagcagcacctctgacgtgagcaaacgagactacgagaacaacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggt cctgTAGtcgccgtcacaaagagcttcaacaggggagaggtgtaagctggggatcctctagagggttgagggtgattt tatgaaaaagaatatcgacatttcttctgcatctatgttcgtttttctattgtctaaaaacgcgtacgctgagggtgaactgca ggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcagggtctcattaccgga ctatgggtgaagctggaftcggagcctccacgaaagggctctggagtggtctggagtaatatggggtaglgaaccac atactataatlcagctctcaaalccagactgacalcatcaaggacaactccaagagcccaaglllctlaaaaalgaacag lctgcaaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattatctacgggtggtagctatgctatggactactgggg ccaaggaaactcagtcacgcgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggcttccccctggcacctctctccaagag cacctctggggggcacagcggccctgggctgcctgtgcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaact caggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctacctcagcagcgtgg tgactgtgccctctagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagccacgaacaccaaggtgg acaagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacacataataagtcgaccgatgcccttgagagccttcaacca gtcagctcctccggltgggcggggcgtgactatctgctggcgcacttatgactgtcttcttatactgcaactctagga caggltccaaacggctccagcttggctglllggcggatgagagaagatttcagcctgatacagatlaaatcagaacg cagaagcgggtctgataaaacagaatttgcctggggcagtagcgcgggtgggtcccacctgaccccatgccgaactcag aagtgaaacgccgtagcggcgatggtagtgtgggggtctcccatgcgagagtaggggaactgccaggcatcaataaa acgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgtgtttgttcgggtgaacgctctcctgagtaggacaatcc ggcgggagcggattgaacgttgcgaagcaacggcccgagggtggcggggcaggacggccgccataaactgccca ggcatcaaatgaagcagaaggccatctgacgggatggccttttgcgtttctacaaaactcttttggttatttttcaaatatcat caaatatgtatccgtcatgagacaataacctgataaatgcttcaataatattgaaaaagggaagatgtagtattcaac attlccgtgtcgccttattlccctllllggcgcatlltgccttccgtllllgctcaccagaaacgctgggtgaaaglaaaaga lgtlgaagatcagtlgggtgcacgagtggtllacalgaactggatclcaacagcgglaagalctllgagaglllccgccc ccgaagaacgttttccaatgatgagcactllaaagtcttctatgttggcgcggtattatccctgtgtgacgccgggcaag agcaactcggctgccgatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcagaaaaagcatcttacggat ggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgtccataacctaggtgataaacactcggcccaacttacttctgacaacga tcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggacatgtaactcgccttgatctgtgggaaccgga gtctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatccctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactat aactggcgaaactacttacttactgtctcccgcaacaattaatagactggatggaggcgggataaagtgcaggaccactt ctgcgtctggccctlccggctggclgtllatlgctgalaalctggagccgggtgagcgtgggtlctgcgggtalcatlgtc agcactggggccagatggtaagccctcccgatctgtagtattctacacgacggggagtcagggaactatggatgaacg aaatagacagatcgtcagataggtgcctcactgattaaagcatgtgaaactgtcagaccaagttactcatatactttaa

[0660]

表14. CAR-EC开关靶靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
		agtcaggacctggcctggggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattaccgacta tgggtlaagctggatcggcagcctccacgaaagggtcggagtggtgggaglaatatggggagtgaaaccacala ctalaatlcagctcctcaaatccagactgacctatcaaggaacacccaagagccaagtttctlaaaaatgaacagctc ggcaactgatgacacagccattactactgtgccaacattattactacgggtggtatgctatgctactactggggcca aggaacctcagtcacctctctcagcctccaccaaggggcccatcggctctccccctggcaccctcctccTAGagc acctctgggggacagcggccctgggctgctgtgcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactc aggcggcctgaccagcggcgtgacacacttccggctgtcctacagctcctcaggaacttacctcagcagcgtggt gactgtgccctctagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagccagcaacaccaaggtgg acaagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacacataataagtcgaccgatgcccttgagagccttcaacca gtcagctcctcgggtggcgcggggcatgactatcgtcggcgactttagactgtctcttlatatgcaactcgttagga cagggtgccaaacggctcagcttggctgttttggcgatgagagaagattttagcctgatacagattaaatcagaacg cagaagcgggtctgataaaacagaatttgcctggcgcgtagcgggtgggtcccacctgaccccatgccgaactcag aagtgaacgccgtagcggcgatggtagtgtggggtctccccatgagagataggggaactgccaggcatcaataaa acgaaaggctcagtcgaaagactgggctttcgtttatctgtgtttgtcggtagaacgtctcctgagtaggacaatcc gccgggagcggatgtgaacgttgcgaagcaacggcccgagggtggcgggcaggacgccgccataaactgccaa ggcatcaaatlaagcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgtttctacaaactcttttcttattttctaatatcatt caaatatglatccgctcagagacaataacccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagatgagatattcaac attcctgtgtcggccttattcccttttggcgcattttgccttctgttttgcaccagaaacgctgggtgaaaglaaaaga tgcgtgaagatcagttgggtgcacgagtggtttacatcgaactggatcctaacagcggtaagatccttgagagtttccgc ccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgtatgtggcggtattatcccggtgtgacgccgggcaag agcaactcggctgccgatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttaccggt ggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtataacactgcggccaacttacttctgacaacga tcggagagaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccgga gctgaatgaagccatacaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtatgcaatggcaacaacgttgcgcaactatt aactggcgaaacttacttactagcttcccggaacaatlaataagactggatggaggcggalaaggttcgaggaccactt ctgcgctcggcccttccggctggctgtttattgtcgtataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgggtatcattgc agcactggggccagatggtgaagccctcccgatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacg aaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattaagcattggtgaactgtcagaccaagttactcatatacttttag attgatttaaaactcatttttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatcctatgacaaaatcccttaacgtga gtittcgttccactgagcgtcagacccctagaaaagatcaaaagatcttcttgagatccttttttctgcgctaacttgc gcttgcacacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtgtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggta actggcttcagcagagcgcagatacaaaactgtccttctagttagccgtatgtagccaccacticaagaactctgt agcaccgccctacatctcgtcgtatcctgttaccagtggtgtgtccagtggtgataagtcgtgtccttaccgggtt ggactcaagacgatagttaccgataaggcgcagcgggtcgggtgaacgggggttcgtgacacagccagcttg gagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggccagcttcccgaaagggaaga aggcggacaggtatccggtaagcggcaggggtcggaaacaggagagcgcacagggagcttcagggggaaacgc ctggtatctttatgtcctgtcgggttgcgccactctgacttgagcgtcgattttgtgatcgtcgtcaggggggcgggagc ctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggttctgtccctttgtcgttctgtcctacatgtcttctcgttta tccccgtattctgtgataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcga gcgagtcagtgagcagggaagcggagagcgccttgatgcggtaatttctccttacgcaactgttgcggatttccaccg catatggtgcactctcagtaaatctgtctgtatgccgcatagtaagccagtafacactcggctatcgtctactgtgactgg gtcatggctgcggcccgaccccgcaacaccggctgacgcggcctgacgggctgtctgtctccggcatccgctta

[0662]

表14. CAR-EC开关靶靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
		cagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggtttaccgfcacaccgaaacgcgcgagggcagc agalcaaltcgcgcggaaggcgaagcgcatgcataatgtccctgcaaatggacgaagcagggtatctgcaaac ctatgctactccgcaagcgtcaatgtctgattcgtllaccaatlatgacaactlgacggctacatcaltacitllctac aacggcacgggaactcgtcgggctggccccgggtgcatTTTTAAATACCgcgagaatagagtgatcgtcaaac caacattgcgaccgacgggtggcgataggcatccgggtggtcctcaaaagcagcttcgctgctgatacgttgctct cgcgccagcttaagacgctaaccctaacgtcgtggcgaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacatg ctgtgcgacgtcggcgatacaaaattgctgtctgcaggtgacgtgatgactgacaagcctcgcgtaccgattat ccatcgggtggatggagcgactcgttaatcgttccatgcgccgcagtaacaattgtcaagcagattatcgcgcagcag ctccgaatagcgccttccccgtggcggttaatgattgccaaacaggctcgtgaaatgcggctggtgcgttcat ccggcgcaagaaccccgatllggcaaatllgacggccagllaagccaltcatgccagtaggcgcgcggacgaaag taaacccactggtgataccattcgcgagcctccggatgacgaccgtatgtatgaatctctctggcggaacagcaaa atatcaccggctcggcaaaacaaattcgtcctcgtattttaccacccctgaccgcgaatggtagattgagaataaa cccttcttccagcgggtcggcgataaaaaatcgagataaccgttggcctcaatcggcgtaaacccgccaccagat gggcattaaacgagtatccggcgagcaggggatcttgcgttcagccatactttcactatccgcattcagag
pBAD-C D19 LS202/H K136X mt	8	aagaaaccaatltgccaatllgcaacagacatlgccgtcactgcgtctllactlggtcttctcgtlaaccaaaccglaac cctgattattgcacggagtcacacttgcctatgcatatgataagattagcggatcctacgtcagcgttttat cgcgaactcttactgtttctccataccggttttttggcgtaaaataattttgttaactttaagaggagaatacatcaacta gtacgcaagttcacgtaaaaaggggtatctagaggttgaggtgattttgaaaaagaatatcgacttcttctgtacat gttcgtttttctattgtacaaacgcatacgtgacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctggga gacagagtcaccatcagttgcaggggcaagtcaggacattagtaaatatttaattggtatcagcagaaccagatggaa ctgttaaacctcgtatcaccatacatcaagattacactcaggagtcctcatcaaggttcagtggtggtctgggaaca gattatctctcaccatlagcaaccggagcaagaagatallgccacttactlltggcaacagggtlaatagcttccglaca cgttcggaggggggacaaagcttgagatcaaacgaactgtggtgcacacatctgtcttctcttcccgccatctgatga gcagttgaaatctggaactgcctctgtcgtgtgcctgtgtaataacttctatccagagaggccaagtacagtggaag gtggataacgccctccaatcgggtaactccaggagagtgfcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcc tcagcagcaccctgacgtgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcaccatcaggg cctgTAGtgcctcgtacaaagagcttcaacaggggagagtgtaagctggggatcctctagagggtgaggtgattt tatgaaaaagaatatcgatttcttctgcatctatgttcgtttttctattgtacaaacgcgtacgtgaggtgaaactgca ggagtcaggacctggcctggcggccctcacagagcctgtccgtcacatgactgtctcaggggtctcattacccga ctatgggtgaagctggallcggcagcctccacgaaagggtctggagtggtgggagtaalatggggtagtgaaccac atactataattcagctcicaaatccagactgaccatcatcaaggacaactcaagagccaagttttctaaaaatgaacag tctgcaactgatgacacagccatttactactgtgcaaacattattactacgggtgtagctatgactgactactgggg ccaaggaaacctcagtcacgtctcctcagcctccacaaagggccctcgttcttccccctggcaccctctctcTAG agcacctctgggggcacagcggccctggcgtgcctgggtcaaggacttctcccgaaaccgggtgacgggtcgtgga actcagggcggcctgaccagcggcgtgcacacctccgggtgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcg tgggtgactgtgcccttagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacaccaagg tgacaagaaggtgagcccaaatcttgacaaaactcacacataaagtcgaccgagtcgcttggagccttcaac ccagtcagctccttccgggtggcgcggggcatgactatcgtcggcgcacttatgactgtcttcttctatcgtcaactcgt ggacaggtgccaacgggtcctcagcttggctgttttggcggtgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcaga acgcagaagcgggtctgataaaacagaatttgcctggcgagtagcggtgtgtccaccctgaccccatgccgaact cagaagtgaacgccgtagcggcgatggtgtagtgggggtctccccatgcgagagtaggggaactgccagggcatcaaat aaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccccttctgtttatctgtgtttgtcgggtgaacgctctcctgagtaggacaaa

[0663]

表14. CAR-EC开关靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

表14. CAR-EC开关靶标相互作用域（抗体）-核苷酸序列		
名称	SEQ ID	序列
		tccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggccggagggtggcgggacggacgccgccataaactg caggcatcaaalaaagcagaaggccalcccgacggatggccttttggcgttctacaaccttttggttatlltctataatc attcaaatatgtatccgctcatgagacaaataacccctgataaaagcttcaataatattgaaaaagggaagatgtagtattca acatttcctgtctgcccttattcccttttttgcggcattttgccttctgttttgcctaccagaacacgtggtgfaaaagtaaa gatgtcgaagaatcagttgggtgcacgagtggtgtacatcgaactggaatcgaacagcggtaagatccttgagagtttcc ccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagtcttgcctatgttggcgcggtattatcccggtgtgacgccgggca agagcaactcggcggccatcacatttctcagaatgacttgggtgagtagtaccaggtcagagaaaagcatcttaccg atggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtataaactgcggccaacttactctgacaac gatcggaggaccgaaggagctaacccgtttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcggtgggaaccg gagctgaatgaagccataccaaacgacgagcglgacaccacgatccctglagcaatgcaacaacgttgcgcaaac attaactggcgaaacttacttactctagcttccccggcaacaattaatagactggatggaggcgataaagltgcaggacca cttctgcgtcggcccttccggctggctgggtttatgtctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgggtatcatt gcagcactggggccagatggttaagccctcccgatcgtagtattatcacacgacggggagtcaggcaactatggatga cgaatatgacagatcgctgagataggtgccctcactgattaagcatlgttaactgtcagaccaagtttactcatatatactt agattgatttaaaactcatttttaatttaaaaggatctagggtgaagatcccttttgataatctcatgacaaaatccctaacg gagtttctggtccactgagcgtcagaccctgagaaaagatcaaaaggatcttctgagatccctttttctgcgcgtaactc ctgcttgcuaaaaaaaaccaccgclaccagcgggtgttgggtggcggatcaagagctaccaactcttttccgaagg taactggcctcagcagagcgcagatlaccaalactgtccttclagtgtagccgtagtltagccaccacttcaagaactct gtagcaccggcctacatacctcgtctgctaactcgtttaccagtggtcgtgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgg gttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggtgaacgggggttcgtgtcacacagccagc ttggagcgaaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcacgttccggaaggga gaaaggcgggacaggtatccggtaaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggagagcttccaggggaaa cgcttggatcttlatagcttctgtcgggttccgcaactctgacttgagcgtcgaattttgtgatgtctgtcagggggcg agcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttctggtcgttctgtggtcgttctgtcgttcttctgt gtlatccctgaltctgttgataaccgtataccgclttagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgag gcagcgagtcagtgagcgagggaagcgggaagagcgccgtgatcggtattttctcttaccgcatctgtggtgatttaca ccgcatatggtgcactctcagtaacaatctgtctgtgatgcgcgcatagttaaagccagtatacactccgctatcgtactgac tgggtcatggtgtgcggccgacaccggccaacaccgcgtgacgcgcctgacgggcttctgtctctccggcatccg ttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggttttaccgtatcaccgaaacgcgcgagcgca gcagatcaattcgcgcggaaggcgaagcggcatgcataatgtgcctgtcaaatggacgaagcagggatctgcaaa ccctatgtactcctgtaagccgtcaattgtctgattcgtttaccaattatgacaacttgacggctacatcattcatttttct acaaccggcacggaactcgtcgggclggccccgggtgcatlltlaaatlaccgcgagaaatagagltgaltcgtcaaa accaacattgcgaccgacgggtggcgataggcatccgggtgggtgtcctcaaaagcagcttccgttggctgatacgttgg ctcggccagcttaagacgctaatacctaactgtctggcgaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaca gctgtgagcagctggcgatacaaaattgtctgtccaggtgatcgtgatgtactgacaagcctcgcgtaccgatta tccatcggtggtgagcgaactgtaatcgttccatgcgcgcgagtaacaattgtcaagcagattatccagcag ctccgaatagcgcccttcccttgcgggggttaattgatttgcacaacaggtcgtgaaatgggctgggtgcgttcat cggggcgaaagaacccgtatttggcaaatatgacggccagttaaagccatcatgcaagtagggcgcgggagcaaa taaacccactgtgtataccattcggagcctcggatgacgaccgtagtgtatgaatctctctgcggggaacagcaaa ataaccgggclgcgaacaacaattctcgtccctgalltaccacccccctgaccgcgaatgggtgagattgagaataa ccttcatctccagcgggtcgtcgataaaaaaatcgagataaaccgttggcctcaatcggcggttaaacccggccaccagat gggcattaaacgagtatcccgcgacgagggaatcttttgcgttcacgcatacttttactactcccgccattcagag

[0664]

表14. CAR-EC开关靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

表14. CAR-EC开关靶标相互作用域 (抗体) - 核苷酸序列		
名称	SEQ ID	序列
LV-EF1a -CD19(F MC63)-B BZ	9	cagggtggcacatttctgggggaatgtgcgcggaacccctatttgttattttctaaatcacattcaaatatgtatccgctcatga gacaalaacccctgataaalgtctcaataaalatgaaaaaggaagaglatagatlatcaacatttccgtgctgcgccctlatcc cttttttggcgcaatttgccttctgttttgcctaccagaaacgcctggtgaaglaaaagatgctgaagatcagttgggtg cacgagtggggtfacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatg atgagcacattttaaagtctgtctatgtggcgcggtattatcccgatttgacgcggcggaagagcaactcggctcgccgat acactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttaccggtggcatgacagtaagagaat tatgcagtgctgcgcataaacatgagtgataacactgcggccaacttactctgcacaacgatcggaggaccggaaggagc taaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaacccggagctgaatgaagccatacca aacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaactacttact ctagcttcccgccaacaafaaatagactggatggaggcggaalaaagttgcaggaccacttctgcgcctcgcccttccgg ctggctgtgtttatgtcgtataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggatcatgtcagcacttggggccagatgg aagccctcccgatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgtctgag ataggtgectcactgattaagcattggtactgtcagaccaagttactacataatactttagatgatttaaaacttcattttaa atttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataaactcatgacaaaatcccttaacgtgagtittcgttccactgagcgtc agaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaaaaaaaacc accgctaccagcgggtgtgtgtgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgc agalaccaaaatactgtcccttctagtgtagccglagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctalacalcctc ctctgclaatcctgtlaccagtggtcgtgccagtggtcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttac cggataaggcgcagcgggtcgggtgaacgggggggttcgtgcacacagccagcttggagcgaacgacctacaccg aactgagatacctacagcgtgagctatgagaaaagcggcagcgttccgaaggggagaaaaggcggacaggtatccgggt aagcggcaggggtcggaaacaggagagcgcacgaggggagcttcaggggggaaacgccttgtatctttatagtcctgtc gggttccgccacctctgacttgagcgtcgaattttgtgatgtctcgtcagggggggcggagcctatgaaaaaacgcgagca acgcgcccttttacgggttcttggccttttgcctgcttctcactgttcttcttgcgttatccctgattctgttgataaa ccgtatfaccgctttagtgatgagtgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtgatcgtgagcgag gaagcgggaagagcgcccaalacgcaaaccgcttccccgcgcgttggccgattcatalatgcagctggcgacgaca ggtttcccgactggaaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagtttagctcactcataggcacccccaggcttt acaatttatgcttccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggaataacaatttcacacaggaaaacagctatgacctga tacgccaaagcgcgaattaacccctactaaagggaacaaaaagctggagctgcaagcttaattgtatgtcttatgcaatact cttgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgcctttacaaggagagaaaaagcacctgcatgccgattg gttggagtaagggtgtacgactgtgccttattaggaaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaa ttgccgcatgtgcagagatattgtatttaagtccctagctcgatacaataaacgggtctctcttggttagaccagatctgagcc tgggagctctctggclaaclagggaaaccactgttlaagccclcaataaagcttgccttgaagtgtclcaaglatgtgtgtcc cgtctgtgtgtgactctgtlaactagagatccctcagacccttllagtacgtgttggaaaactctctagcagttggcgccgga acagggaacctgaagaagcgaagggaaccagagctctctcgacgcaggactcggcttgcgtgaagcgcgcacggcaa gaggcgaagggcgccgactgtgtgagtagccaaaaattttagctagcggaggttagaaggagagagatgggttcg agagcgtcagtaftaaagcgggggagaatttagatcgcgatgggaaaaaattcgttaaggccagggggaaagaaaaa atataaattaaaaatataatgtagtgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttatcctggccctgttagaacatcag aaggtgtgagacaaatactgggacagctacaaccatccctcagacaggtatcagaagaacttagatcattatataataca gtagcaaccctctattgtgtgctatcaaaagtagatagataaaagacaccaaggaagcttttagacaagatagagggaagag caaaacaaaaglaagaccaccgcacagcaagcggccgctgactctcagaccctggaggaggagatagagggacaat tggagaagtgattatataaataataaagtagtaaaaaatgaaccatttagaggtagcaccaccaagggcaagagagaaga gtgtgtgcagagagaaaaaagagcagtggtgaatagagacttgttctctgggttcttggagcagcaggaagcactat

[0665]

表14. CAR-EC开关靶靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
		ggcgcagcccaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaatttgcctga gggctatlgaggcgcaacagcatctgttgcaacacacagtcggggcatcaagcagctccaggcagaatcctggctg tggaaagalacclaaaggatcaacagctcctggggatllggggllgclctggaaaacatllgcaccacclgcltgcctt ggaaatgctagttggagtaataatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgaggacagagaaattaa caattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaaaatgaacaagaattattggaat tagataaatgggcaagtttgggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattatcataatgatagtagga ggcttggtaggtttaagaatagttttgctgtacttctatagtgatagagttaggcaggagattaccattatcgtttcag accacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggatagaagaagaagggtggagagagagacagag acagatccatcagtagtgacggatctgacgggttaacttttaaagaaaaggggggatgggggtacagtgcag gggaagaalagtagacataatagcaacagacalacaactaaagaaltacaaaaacaaltacaaaalticaaattt atcgagctttgcaaaagatggataaagtttaaacagagaggaatcttgcagetaatggaccttctaggtcttgaaggag tgctCGTGAGGCTCCGGTGCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCAC AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTA GAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCT CCGCCTTTTTCCCGAGGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTC GCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAA GTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCT TGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTA AGGAGCCCCCTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTT TCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTT TTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGT ATTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGC GCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCG GACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGC GCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTTCGGCA CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGG AGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCA CCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTG ACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAG CTTTTGGAGTACGTCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGG AGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCA CTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTT CATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGG TGTCGTGAaggaaatcggtacgcggcgccggggatccatggccttaccagtgaccgcttgcctgcgcg tggccttgcgtccacgcggccaggcggaatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggaga cagagtcaccatcagltgcagggaagtcaggacattagtaaatattaaattggatcagcagaaaccagatggaact gttaaaactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcctcaatcaagggtcagtgccagtgggctctggaacaga ttattctcaccatlagcaacctggagcaagaagalattgccacttcttggcaacagggtlaatcagcttccglacacg ttcggaggggggaccaagctggagatcacagggtggcggtggctcggcggtggtgggtcgggtggcgcggtatct gaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcagg

[0666]

表14. CAR-EC开关靶靶相互作用域(抗体)-核苷酸序列

名称	SEQ ID	序列
[0667]		ggctcaltaccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggtggagtaaatgg ggtagtgaaccacalactataaltcagctclcaaatccagactgaccatcalcaaggacaactccagagccaaglttl ctlaaaatgaacagctctgcaaacctgatgacacagccatttactactgtgccaacattattactacgggtgtagctatgct atggactactggggccaagggaacccctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccggaccaccaacaccgg cggccaccatcgctgcagcctctgtcctgcgcccagaggcggtgccggccagcgccggggggcgagtgac acgagggggctggacttcgctgtgatctacactgtggcgccctggccgggactgtgggtccttctcctgact ggttatcacccttactgcaaacggggcagaagaactcctgtatatattcaaacacccatttatgagaccagtacaaa clactcaagagggaagatggctgtagctgcccgttccagaagaagaaggagggatglaactgagagtgaaagtlc agcaggagcgacgacgccccgcgtacaagcaggggccagaaccagctctataacgagctcaatctagacgaaga gagagtagatgttttgacaagagacgtggccggaccctgagatgggggggaaagccgagaagggaagaacct cagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgaggccctacagtgagatgggatgaaggcgagc gccggaggggcgaaggggcacgatggcctttaccagggtctcaglacgcccacgaagacacclacgacgcccttca catgcaggccctgccccctcgctaagtcgacaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattctaa clatgtgtccttllacgctatgtggatagctgcttlaatgcccttggatcatgctattgcttccglatgcttllcatlltctcc tectgtataaatcctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggccgtgtcaggcaacgtggcggtgtgactgtgtt tgcgtacgcaacccccactgggtggggcattgccaccactgtcagctccttccgggacttgccttccccctccctatt gccacggcggaactcagccgcttgccttgcctgctgacaggggctcggtgtgggactgacaattccgt ggtgtgtcggggaagctgacgtccttccatggctgtcgcctgtgtgccacctggattctgcggggacgtccttctg ctacgtccttccgcccctcaatccagcggaccttccctcccgccgtgtgcccgtctgcggccttcccgcttctc gcccttgcctcagacgagtcggatctccttggggccctcccgccctggaattcgagctcggtacctttaagacca atgacttacaaggcagctgtagatcltagccactlltlaaaagaaaaggggggacgggaaggctaatlcaactcccaac gaagacaagatctgttttgccttactgggtctctctgttagaccagatctgagccgggagctctctggctaaactag ggaaccacactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtcttcaagtagtgtgtgcccgctgtgtgtgactctggtaa cttagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagtcatgtcatcttatttaccagtattataa ctgtcaaaagaaatgaatafagagagtgagaggaaactgtttatgtcagcttataatggttacaataaagcaatagcatc acaaatctcacaataaagcatttttctactgcattctagttgtgtgtttgtccaaactcaatgatatctatctatgtctggct clagctalcccggccctaacctccgcccagtlccgcccattcctcccccagggctgactaatlltllatllatgcagaggc cgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggccctaggctttgtcgtcagacg taccacattcggcctatagtgagctgattacgcgcgtcactggccgtcttttacaacgtcgtgactgggaaaacct ggcgttacccaacttaatgccttgacgacatcccccttccgagctggcgtaatagcgaaggggcccgaccgat cgcccttcccaacagtgccgagcctgaatggcgatggcgacgcgccctgtagcggcgattaaagcgcgcg gtgtgtgtgttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcagcgccctagcgcccgctccttgccttctcccttcttct cgccacgttccgggttcccgclcaagcltaaatcgggggclcccltaggggtlccgalltagtctllacggcacct cgaccccaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtggccatcgccctgatagacggttttccgccccttgacgtt ggagtcacgttcttaatagtgacgttcttccaaactggaacaacactcaacctatctcggtctattctttgatitaaa gggatttgcggatttccgctattggttaaaaatgagctgatttaacaaaatttaacgcgaatttacaacaaatattaac gtttacaatttc
对于表 12: 加粗、加下划线、大写 = 琥珀突变位点		

表15. CAR-EC开关靶靶相互作用域(抗体)-氨基酸序列

名称	SEQ ID	序列
野生型抗 CS1 抗体的轻链	10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVGIAGVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDVATYYCQQYSSYPYTFGGQGTKLEIK
野生型抗 CS1 抗体的重链	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDISRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQGTLVTVSS
抗 EGFRvIII 抗体 (Hu806 VL) 的轻链	12	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTDYTLTITSSLPEDFATYYCVQYAFQFPWTFGGGGTKLEIK
抗 EGFRvIII 抗体 (Hu806 HL) 的重链	13	QLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWRQPPGKGL EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNSVTAAD TATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS
抗 BCMA 抗体 (BCMA98) 的轻链	14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRANQGINSNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTITSSLPEDFATYYCQQFTSLPYTFGGQGTKLEIK
抗 BCMA 抗体 (BCMA98) 的重链	15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRS EDTAVYYCVRHGYDGYHFLFDYWGQGTLVTVSS
抗 CD19-Fab 轻链	16	DIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD19-Fab 重链	17	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

[0668]

表16. CAR-EC小分子开关TID-氨基酸序列

名称	SEQ ID	序列
SS-14(生长抑素类似物)	18	Ala-Gly-环(Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)
OC(生长抑素类似物)	19	D-Phe1-环(Cys2-Phe3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
TOC(生长抑素类似物)	20	D-Phe1-环(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8

[0669]

表16. CAR-EC小分子开关TID-氨基酸序列

名称	SEQ ID	序列
物)		
TATE(生长抑素类似物)	21	D-Phe1-环(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
NOC(生长抑素类似物)	22	D-Phe1-环(Cys2-1-NaI3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
NOC-ATE(生长抑素类似物)	23	D-Phe1-环(Cys2-1-NaI3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
BOC(生长抑素类似物)	24	D-Phe1-环(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
BOC-ATE(生长抑素类似物)	25	D-Phe1-环(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
KE108(生长抑素类似物)	26	Tyr-环(DAB-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe)
LM3(生长抑素类似物)	27	p-Cl-Phe-环(D-Cys-Tyr-D-Aph(Cbm)-LysThr-Cys)D-Tyr-NH2
BN(蛙皮素类似物)	28	pGlu1-Gln2-Arg3-Leu4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH2
RP527(蛙皮素类似物)	29	N38-Gly-5-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH2]
德莫蛙皮素1 (Demobesin 1)(蛙皮素类似物)	30	N40-1-bzlg0 [D-Phe6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu-NHEt13]
德莫蛙皮素4 (Demobesin 4)(蛙皮素类似物)	31	N4-[Pro1-Gln2-Arg3-Tyr4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Nle14-NH2]
BBS-38(蛙皮素类似物)	32	(N α His)Ac- β -Ala- β -Ala-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Cha13-Nle14-NH2]

[0670]

表16. CAR-EC小分子开关T1D-氨基酸序列

名称	SEQ ID	序列
物)		
BAY 86-4367(蛙皮素类似物)	33	3- 氧 基 -4- 三 甲 基 铵 - 苯 甲 酰 基 -Ala(SO ₃ H)-Ala(SO ₃ H)-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-NMeGly11-His12-Sta13-Leu14-NH ₂]
MG (微小胃泌素 (minigastrin)类似物)	34	Leu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH ₂
MG0 (微小胃泌素类似物)	35	D-Glu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH ₂
MG11 (微小胃泌素类似物)	36	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
H2-Met (微小胃泌素类似物)	37	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
H2-Nle (微小胃泌素类似物)	38	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂
德莫胃泌素 (Demogastatin) (微小胃泌素类似物)	39	N4-D-Glu-(Glu)5-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
环-MG1 (微小胃泌素类似物)	40	c(γ-D-Glu-Ala-Tyr-D-Lys)-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
MGD5 (微小胃泌素类似物)	41	Gly-Ser-Cys(琥 珀 酰 亚 胺 基 丙 酰 基 -Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂)-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂
布舍瑞林 (Buserelin) (GnRH类似物)	42	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu) 6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC ₂ H ₅
戈舍瑞林 (GnRH类似物)	43	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu) 6-Leu7-Arg8-Pro9-AzGly10-NH ₂

[0671]

表16. CAR-EC小分子开关TID-氨基酸序列

名称	SEQ ID	序列
亮丙瑞林 (GnRH 类似物)	44	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Leu6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
那法瑞林 (Nafarelin) (GnRH 类似物)	45	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Nal(2)6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
曲普瑞林 (Triptorelin) (GnRH 类似物)	46	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Trp6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly10-NH2
阿巴瑞克 (Abarelix) (GnRH 类似物)	47	Ac-D-Ala1-D-Cpa2-D-Ala3-Ser4-Tyr5-D-Asp6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
阿克林 (Acyline) (GnRH 类似物)	48	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph(Ac)5-D-Aph(Ac)6-Lcu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
安雷利克斯 (Antarelix) (GnRH 类似物)	49	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-Hci6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
安替肽 (Antide) (GnRH 类似物)	50	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Lys(Nic)5-D-Lys(Nic)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
阿扎林 B (Azalinc B) (GnRH 类似物)	51	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph5-D-Aph(Atz)6-Lcu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2 (Atz)
西曲瑞克 (Cetrorelix) (GnRH 类似物)	52	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-Cit6-Leu7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2
地加瑞克 (Degarelix) (GnRH 类似物)	53	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph(L- 氢化乳清酰基)5-D-Aph(氮甲酰基)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2

[0672]

表16. CAR-EC小分子开关TID-氨基酸序列

[0673]

名称	SEQ ID	序列
加尼瑞克 (Ganirelix) (GnRH 类似物)	54	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-hArg (Et2)8-Pro9-D-Ala10-NH2 (Et2)6-Leu7-hArg
奥扎瑞克 (Ozarelix) (GnRH 类似物)	55	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-N-McTyr5-D-hCit6-Nlc7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2
LHRH	56	Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2

表17. CAR-EC开关连接子-氨基酸序列

[0674]

名称	SEQ ID	序列
连接子	57	(GGGGS) _n , 其中 $n \geq 1$
25 氨基酸连接子	58	SSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDG

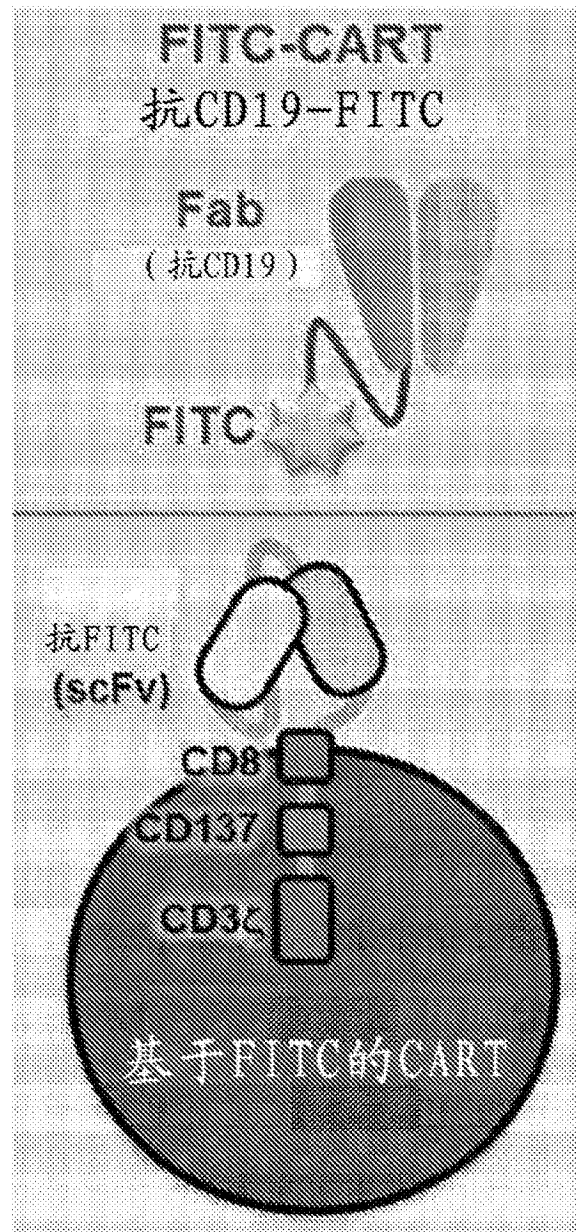


图1

抗CD19 Fab

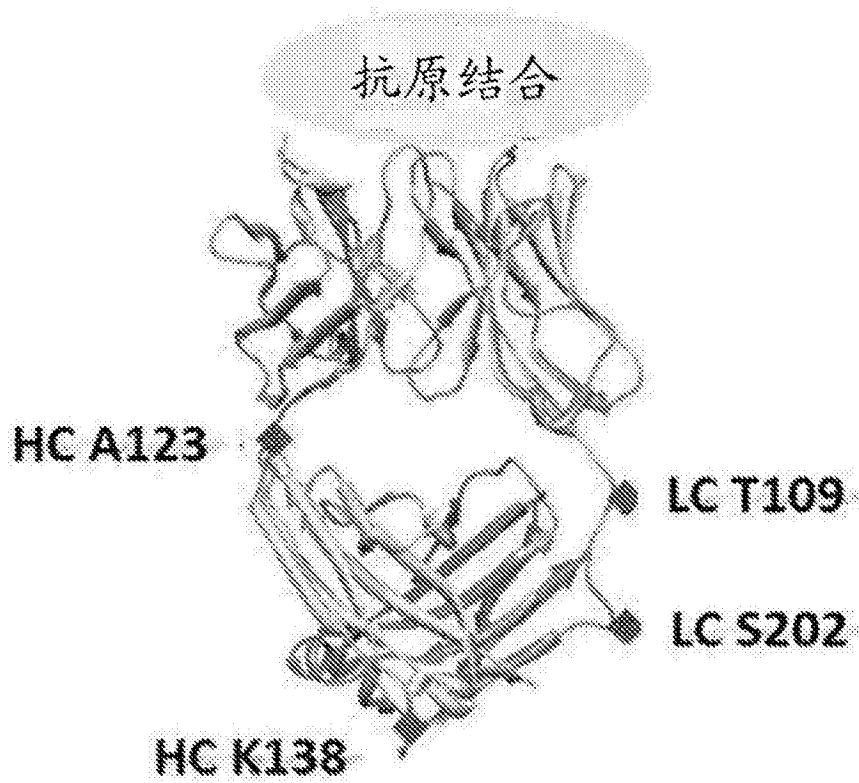


图2A

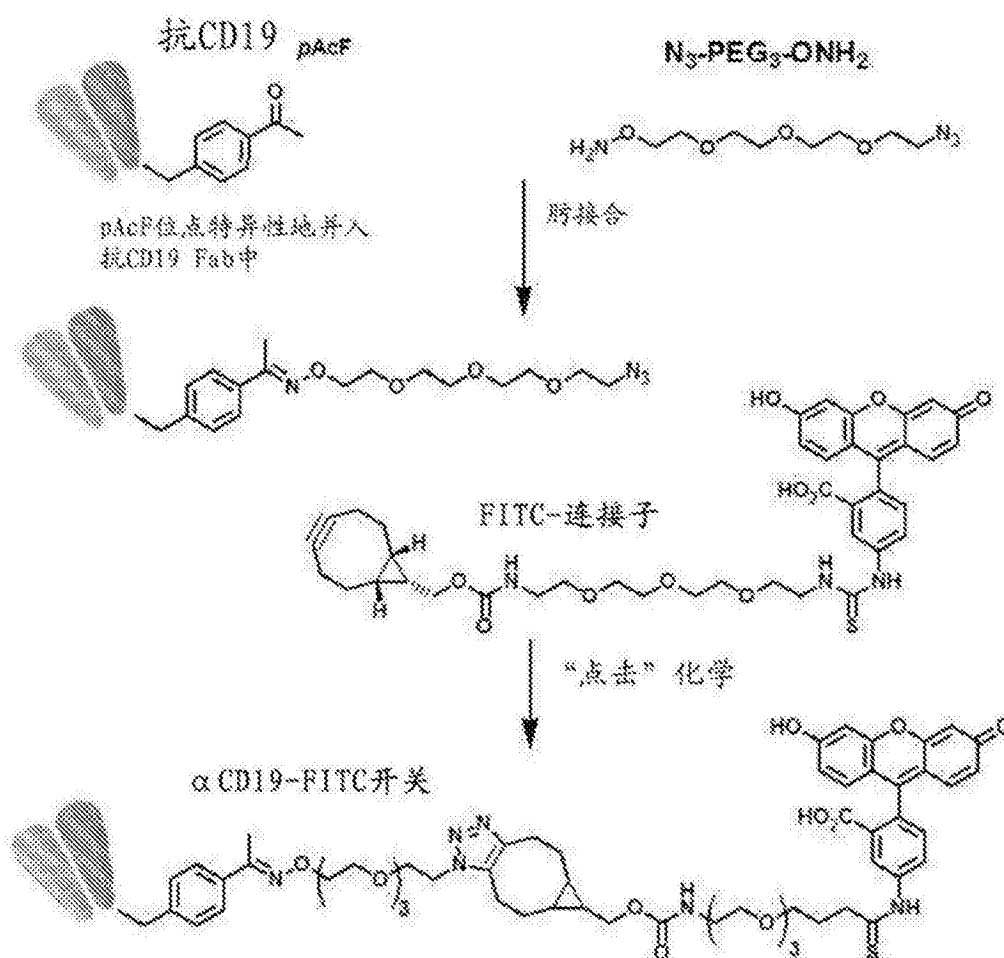


图2B

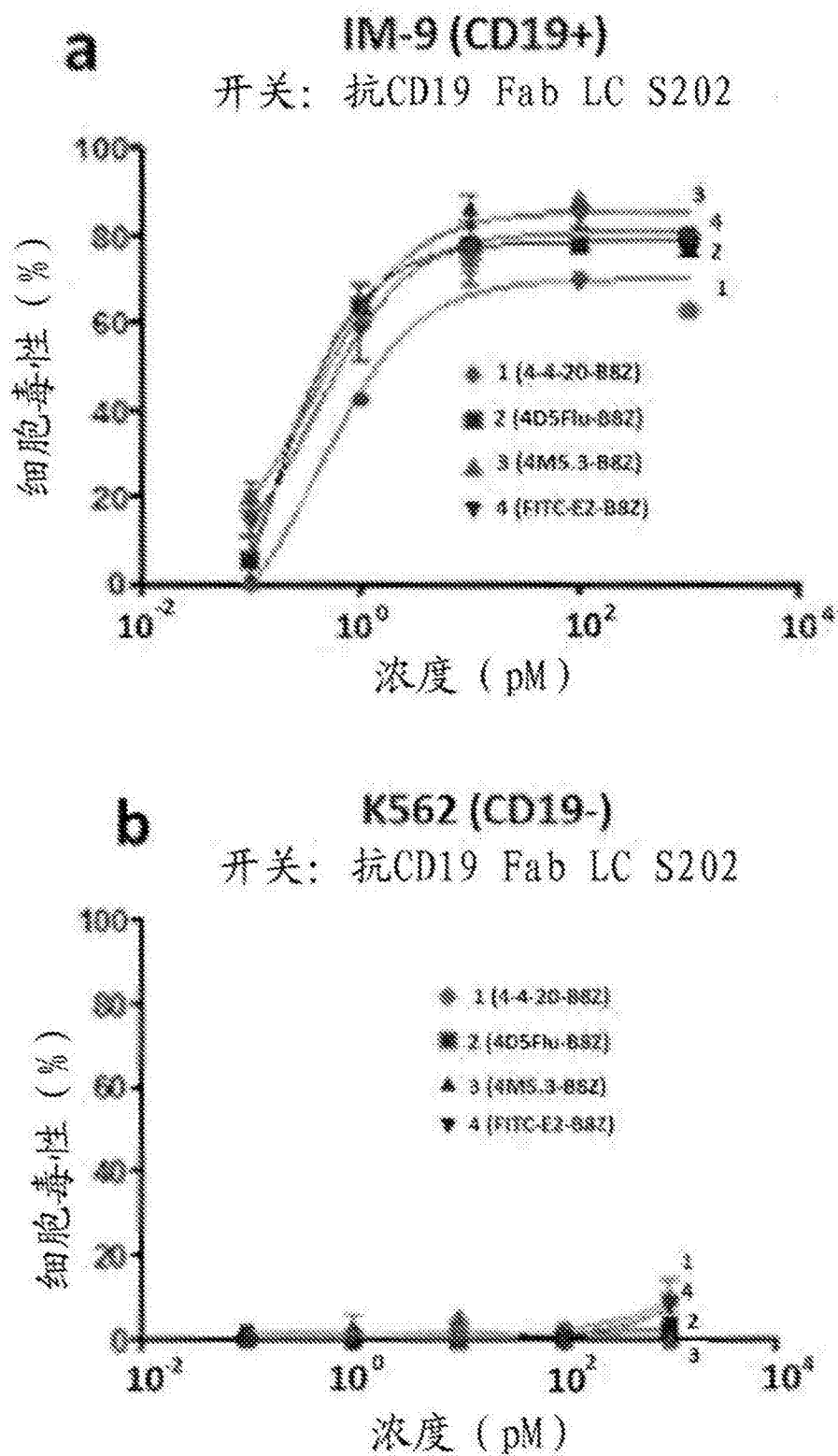


图3A-B

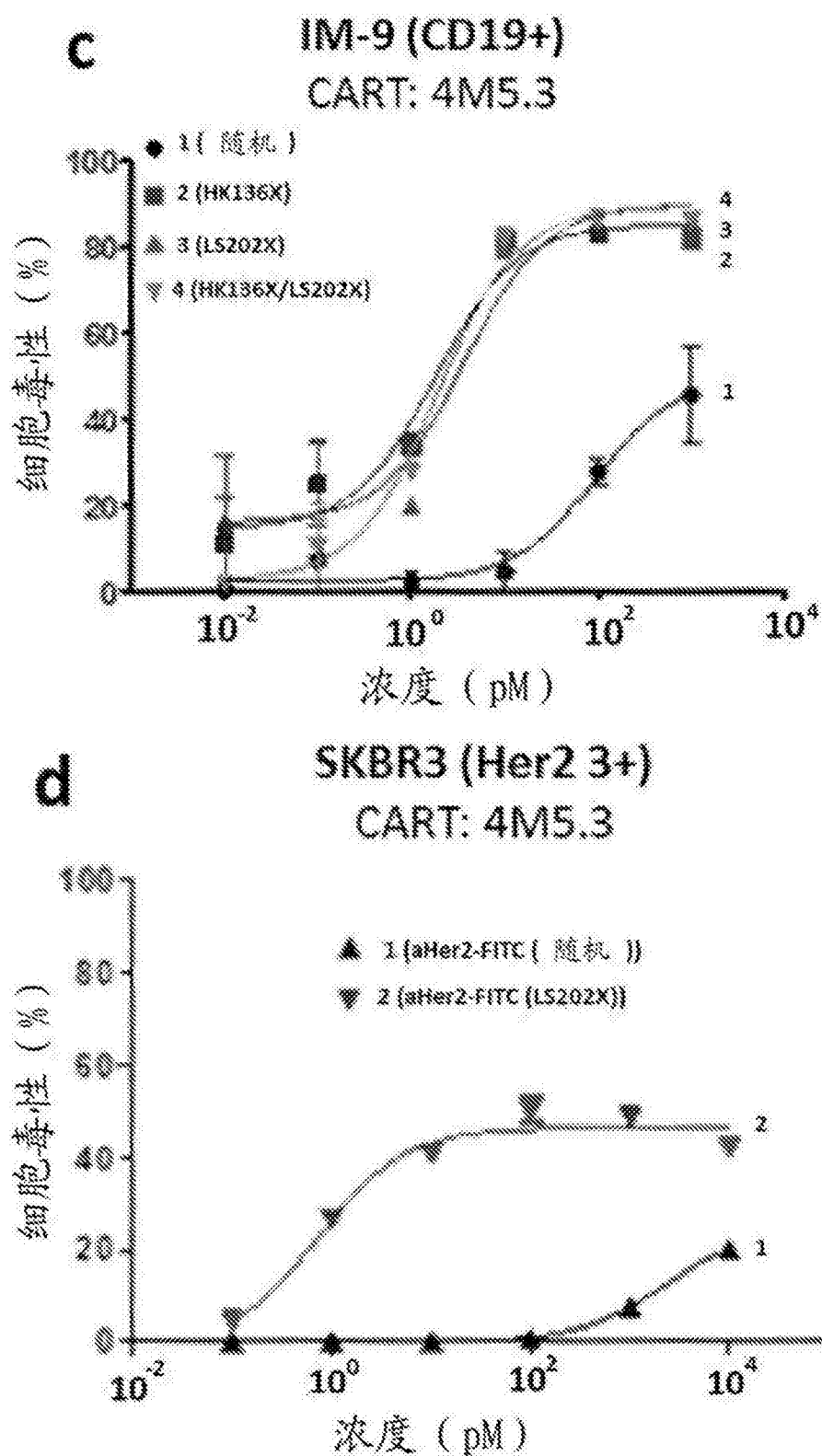


图3C-D

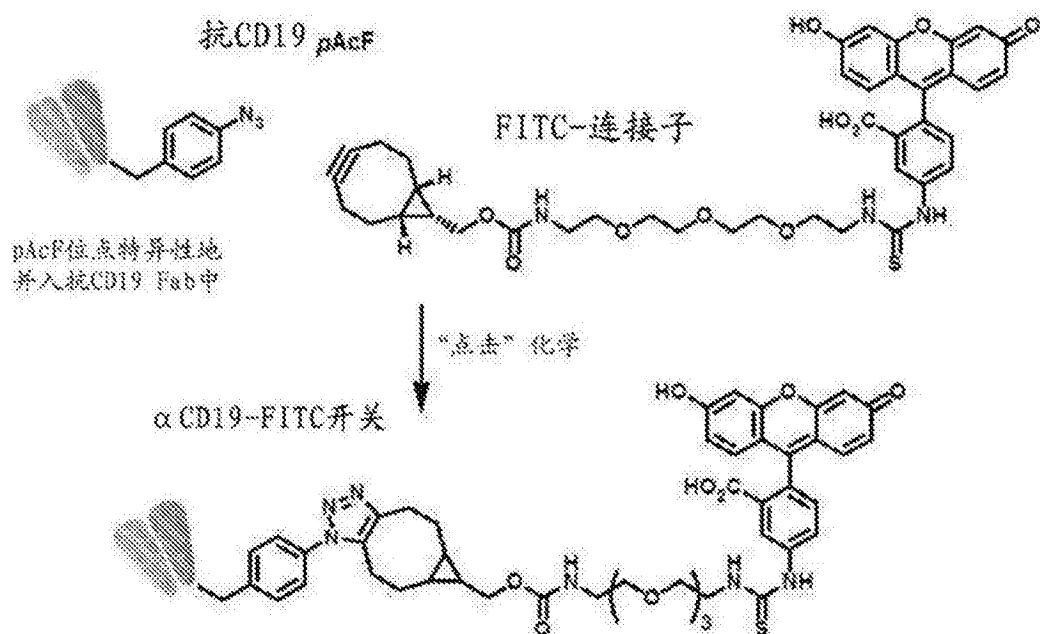


图4A

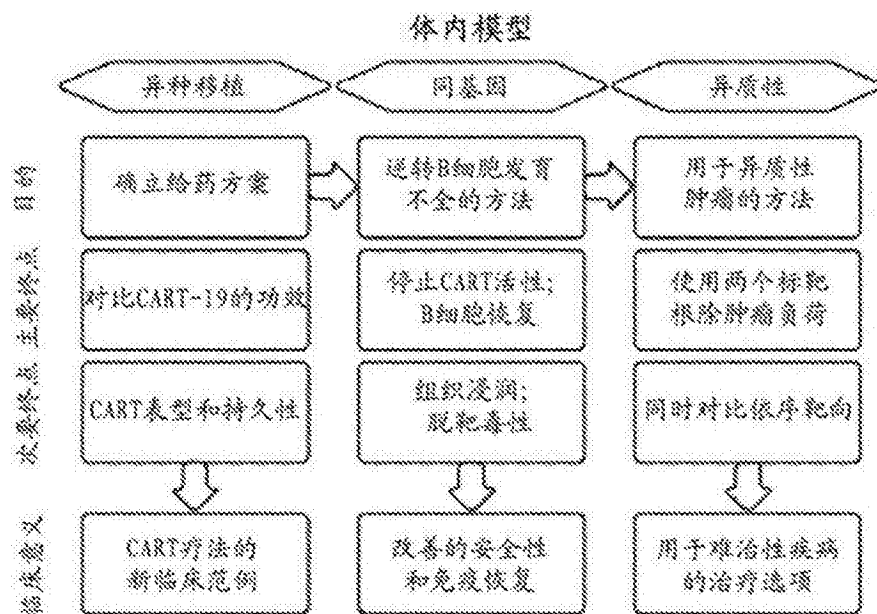


图4B

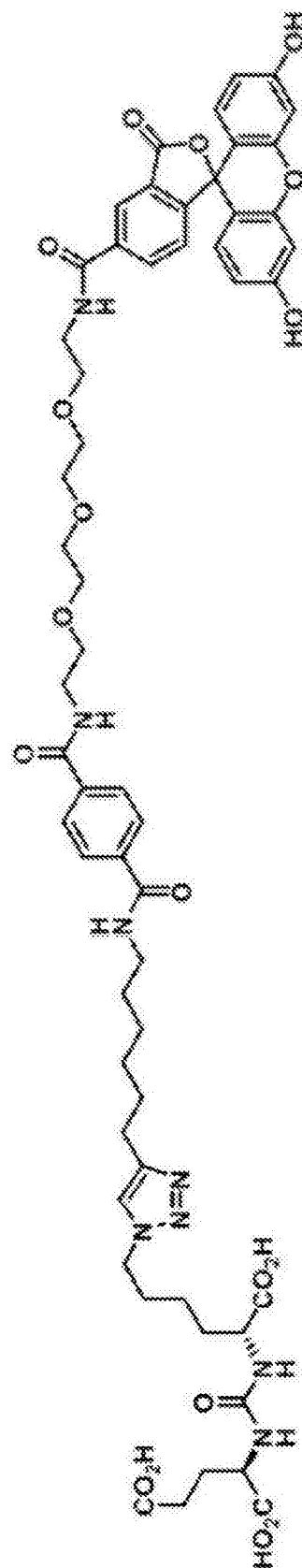


图5A

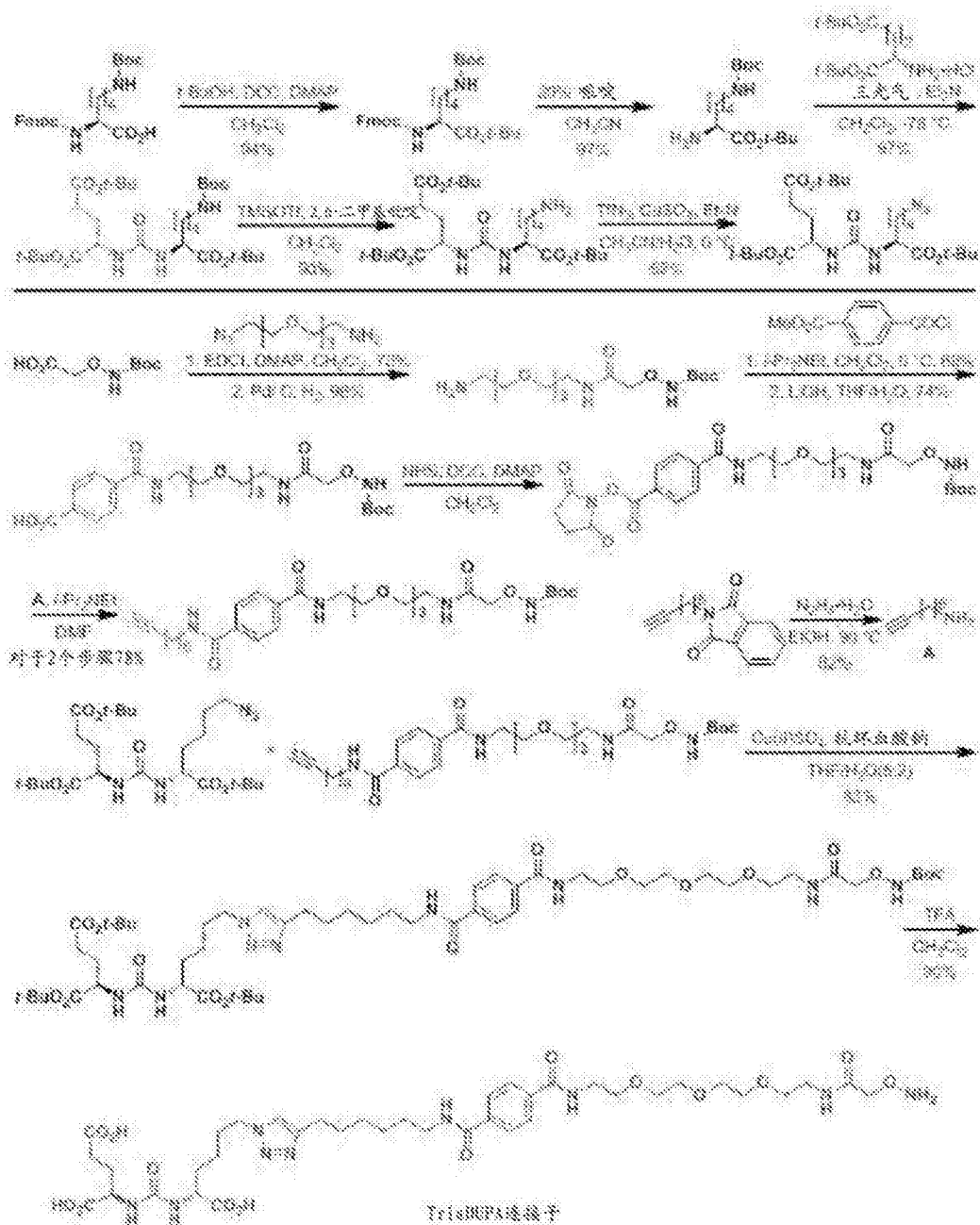


图5B

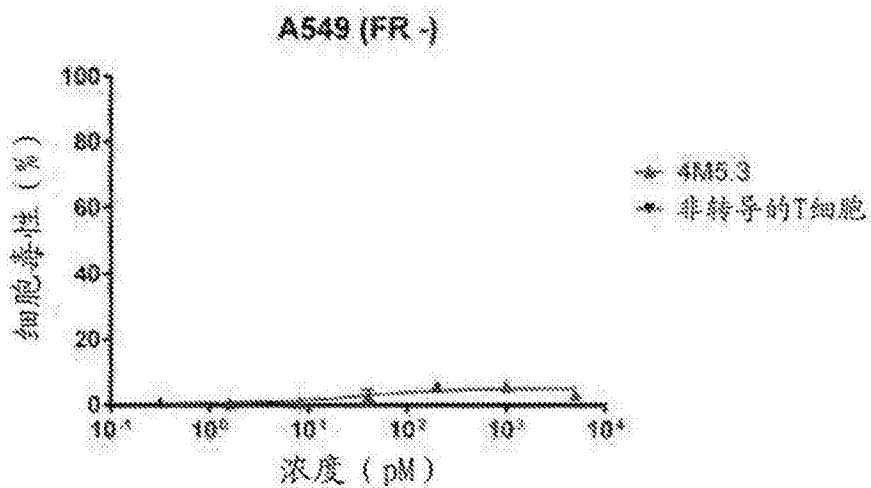
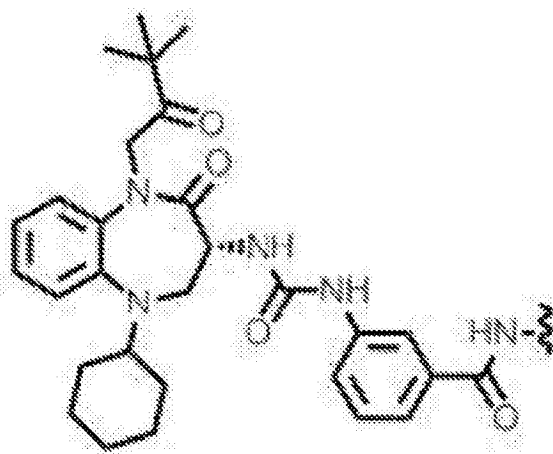


图6C



CCK2拮抗剂

图7

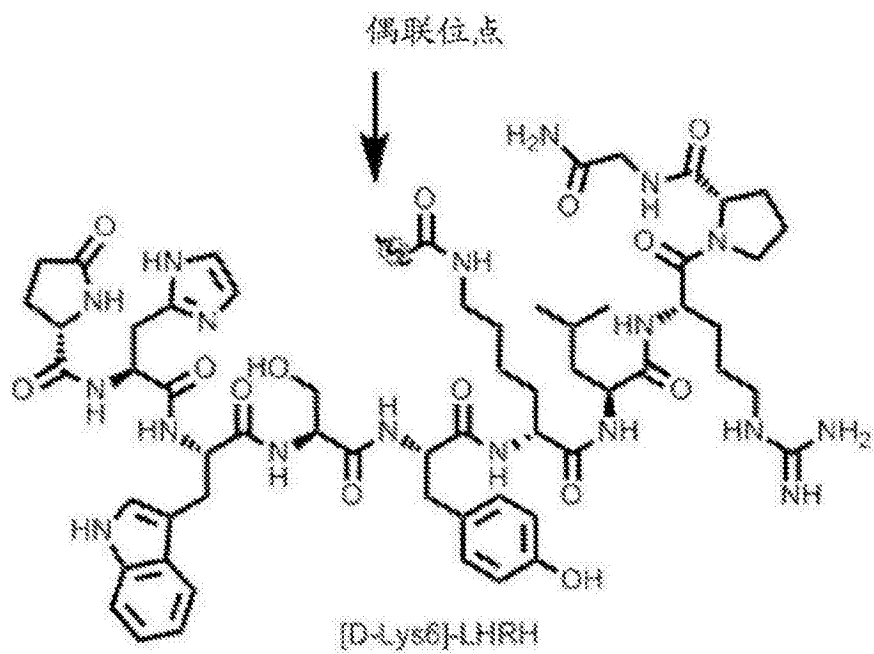


图8

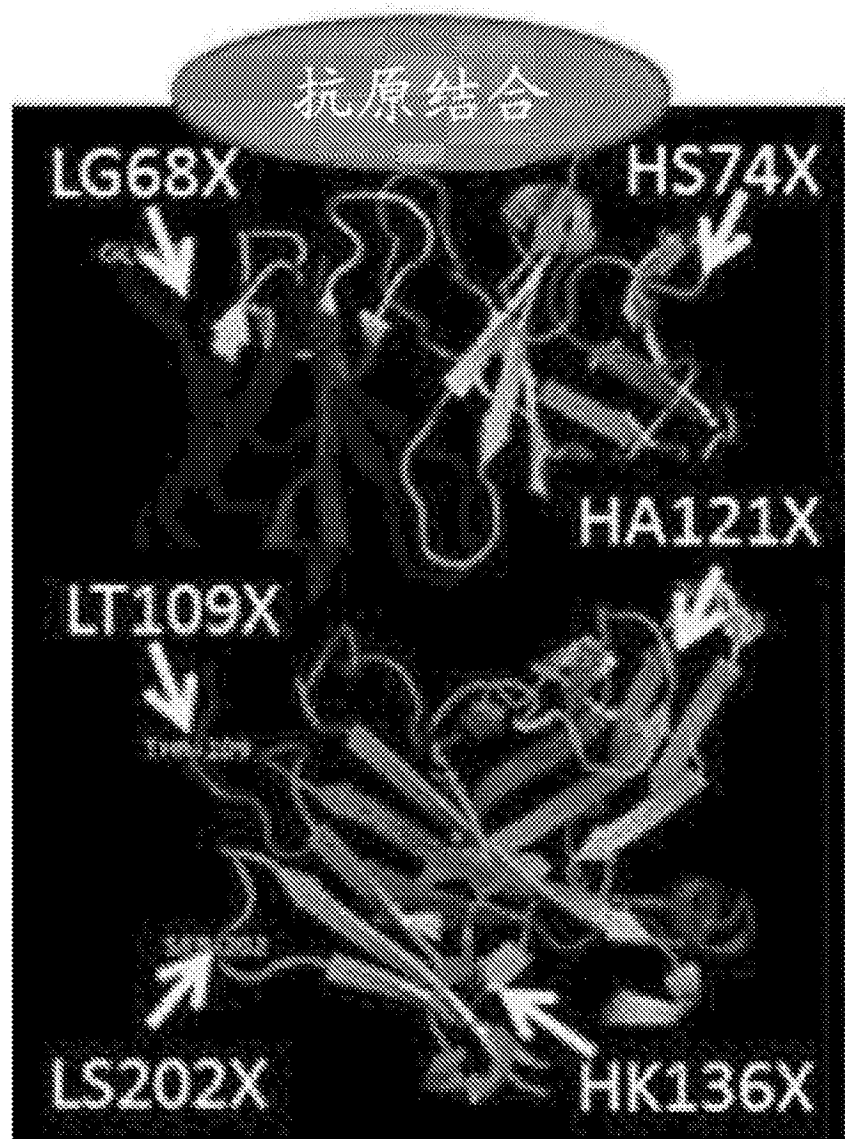


图9A

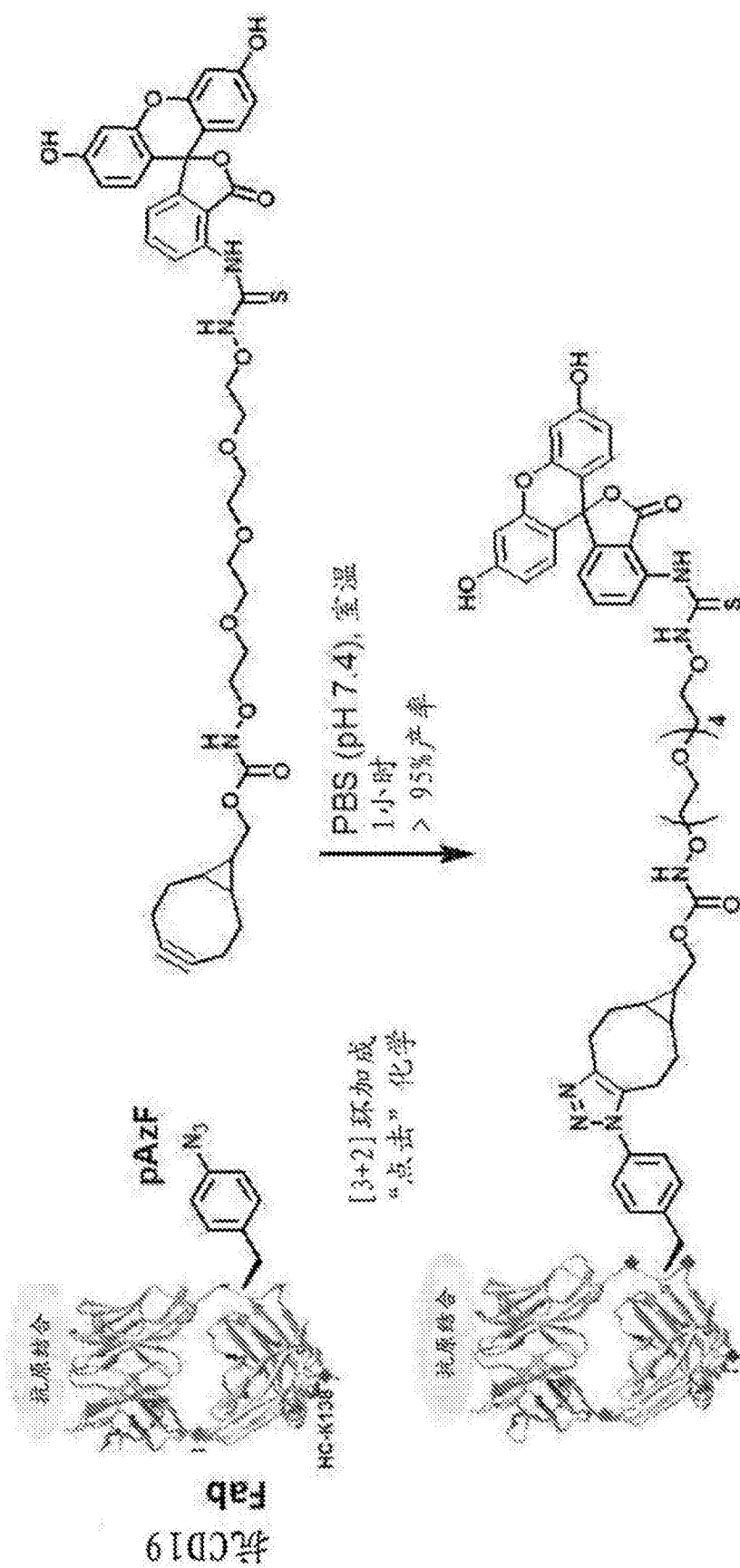


图9B

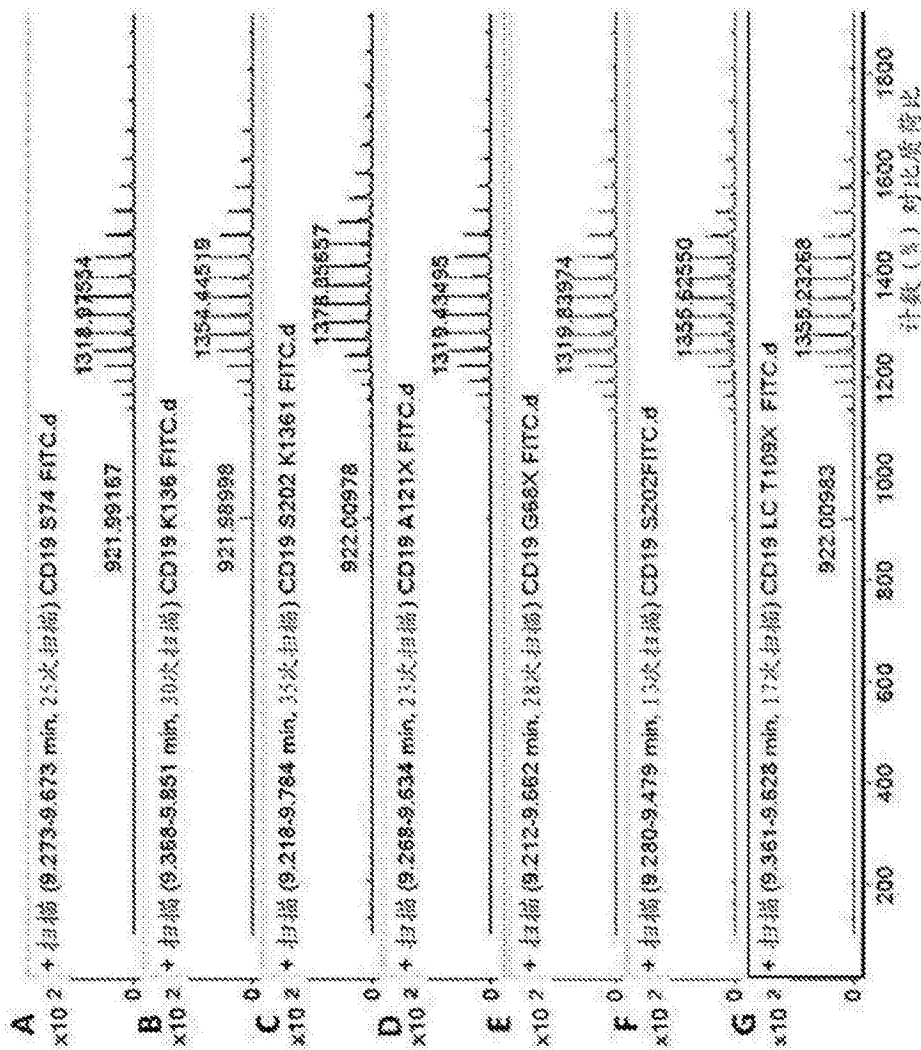


图10A-G

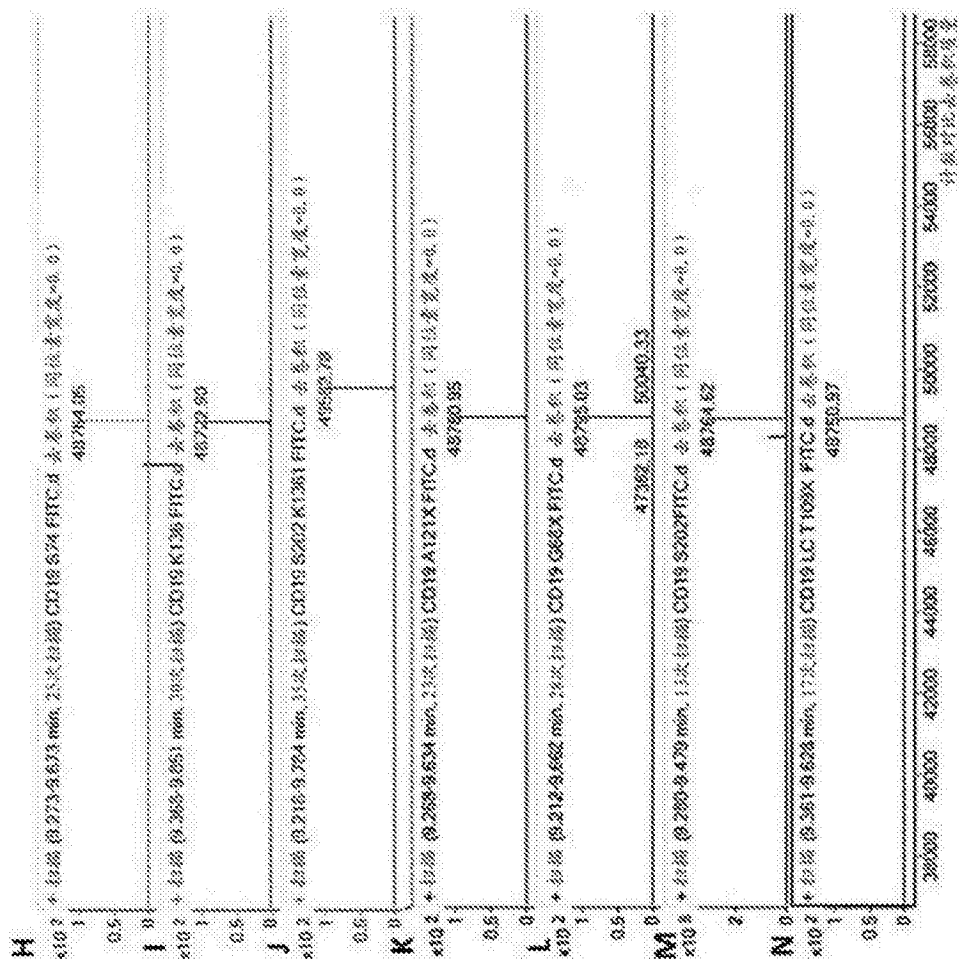


图10H-N

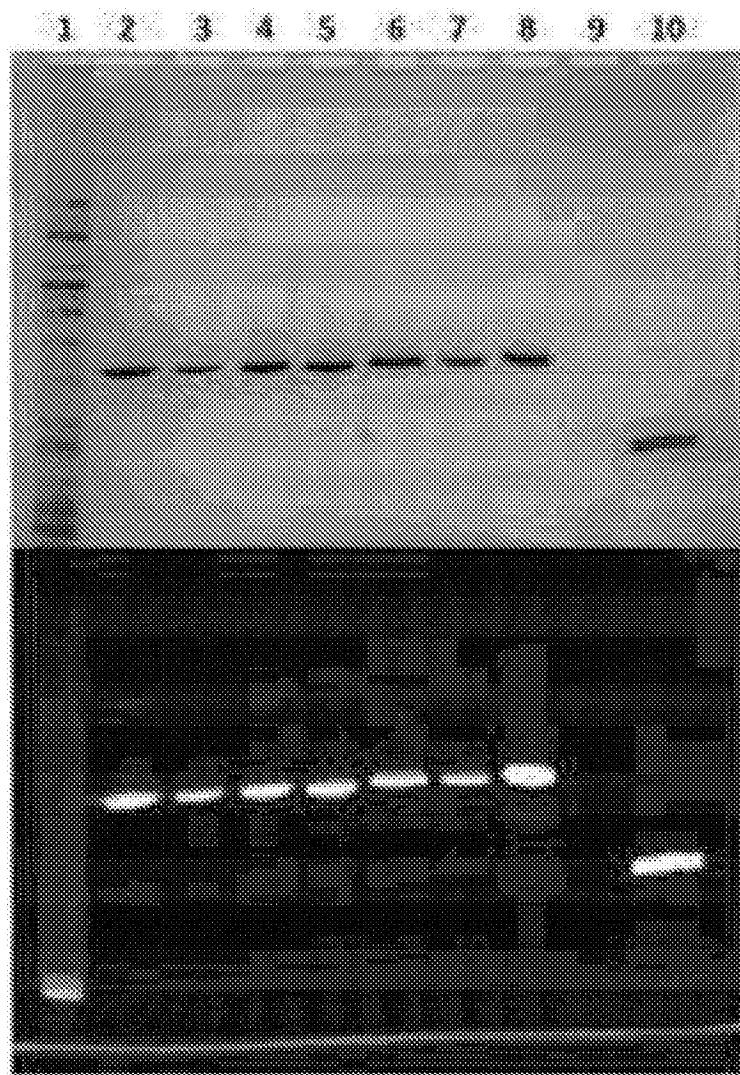


图11

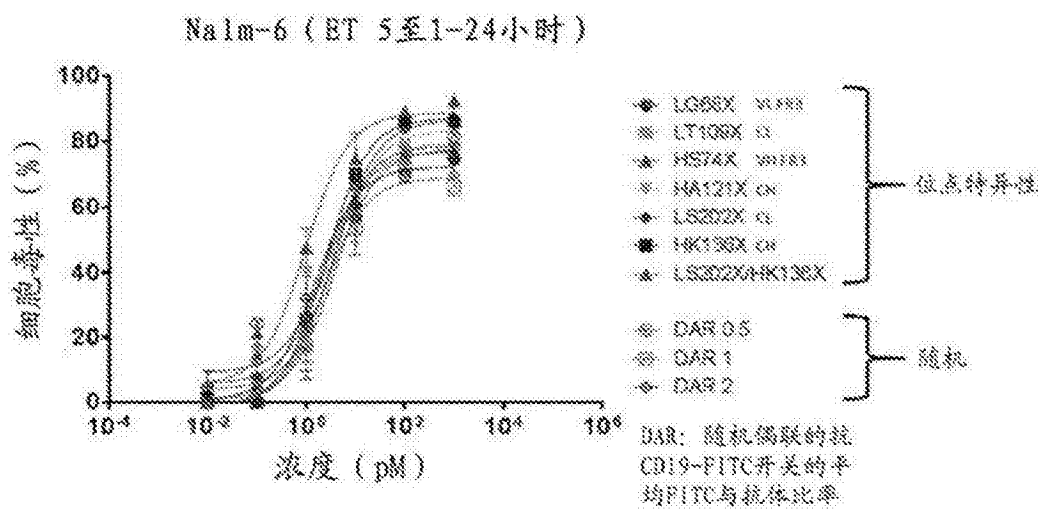


图12

C4-2异种移植模型

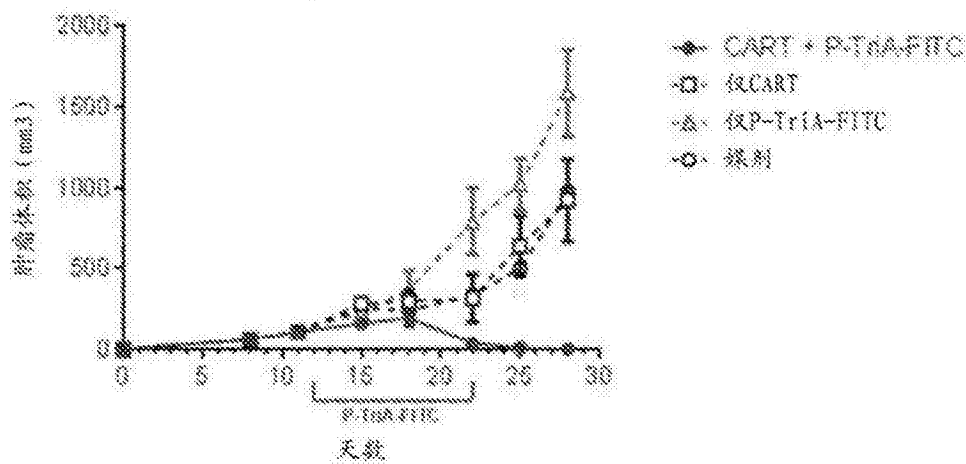


图13

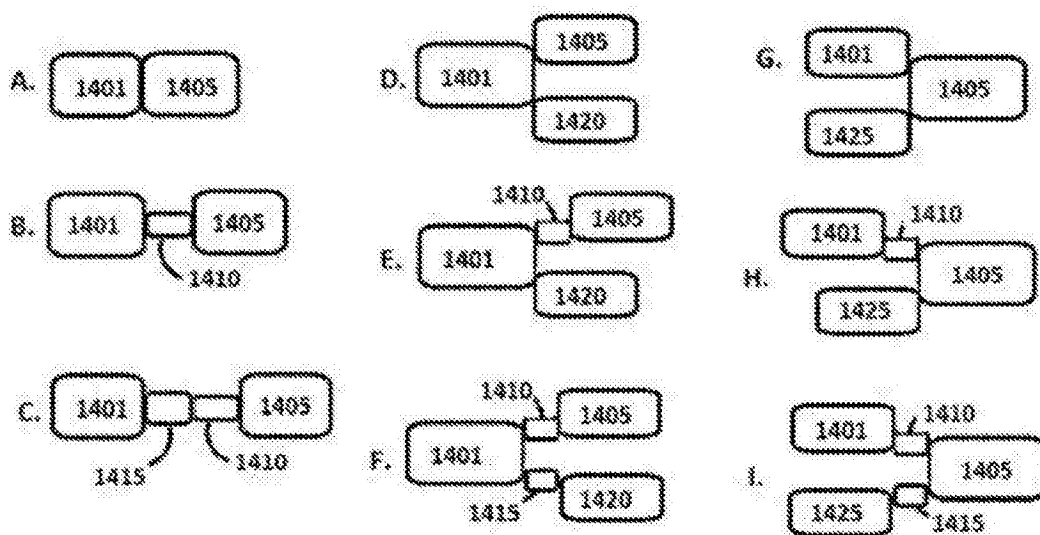


图14

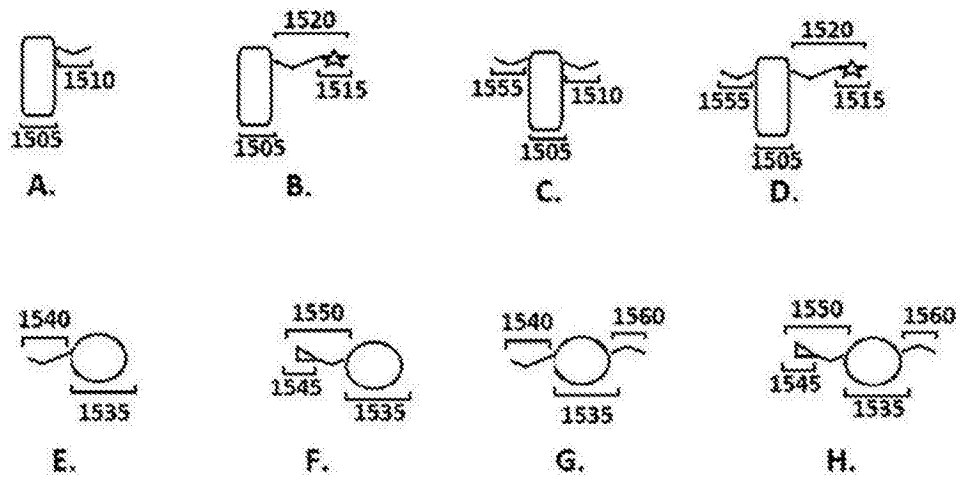


图15

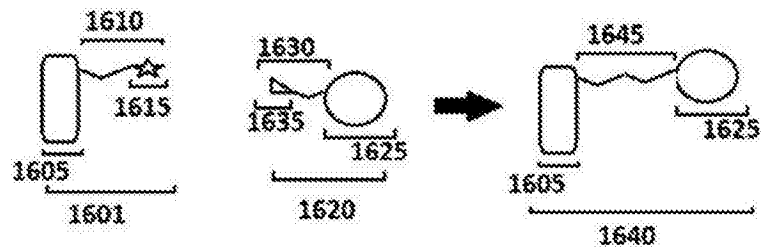


图16

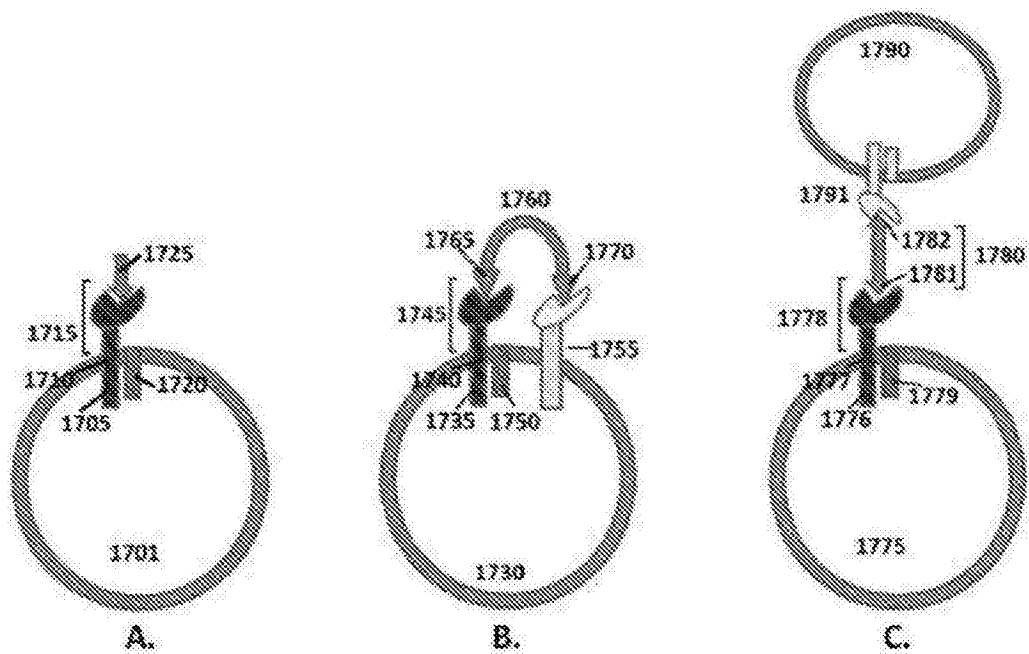


图17

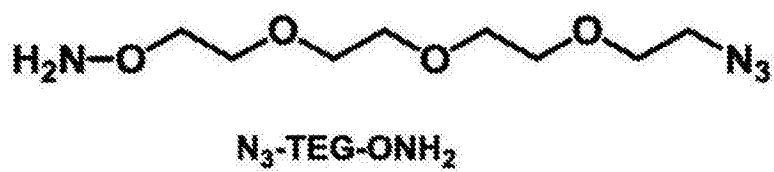
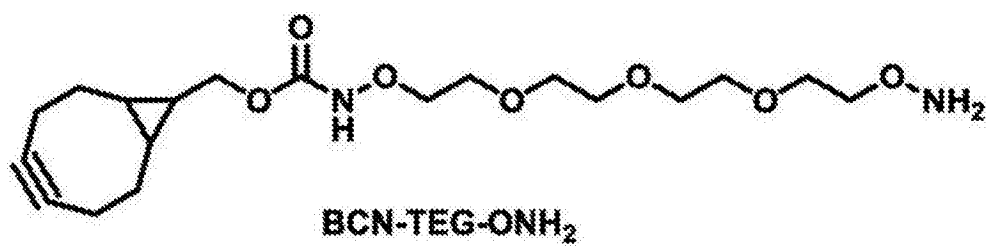


图18

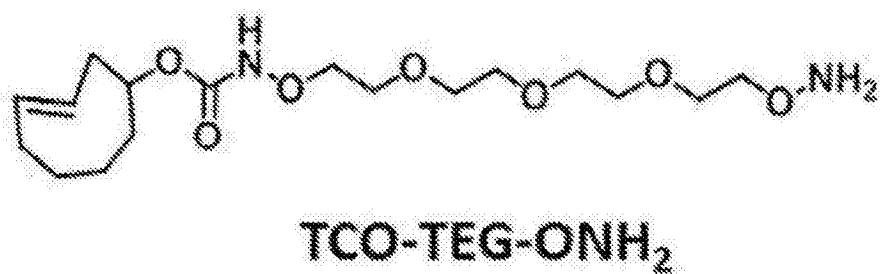
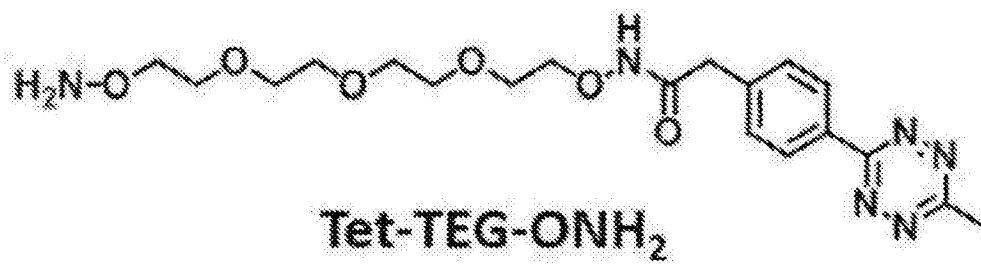


图19

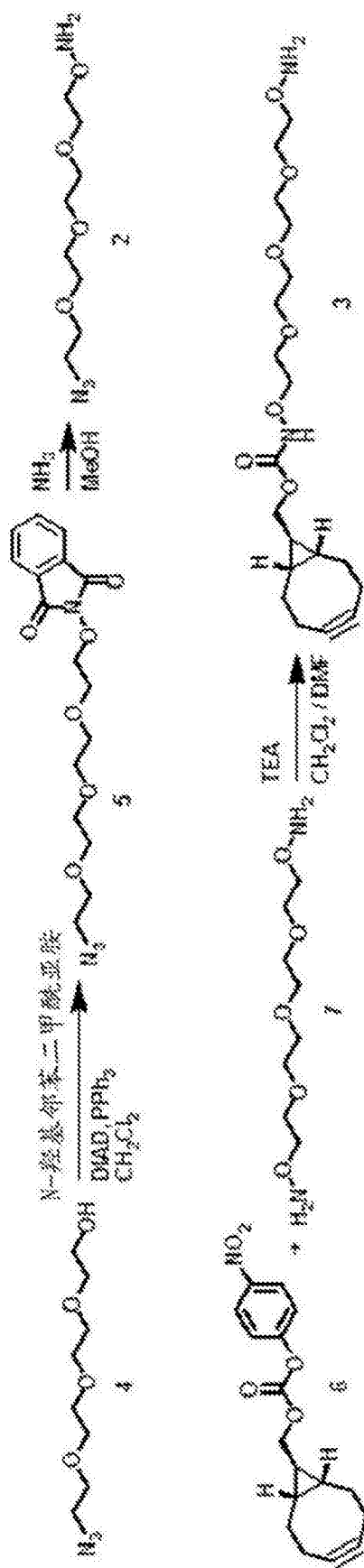


图20

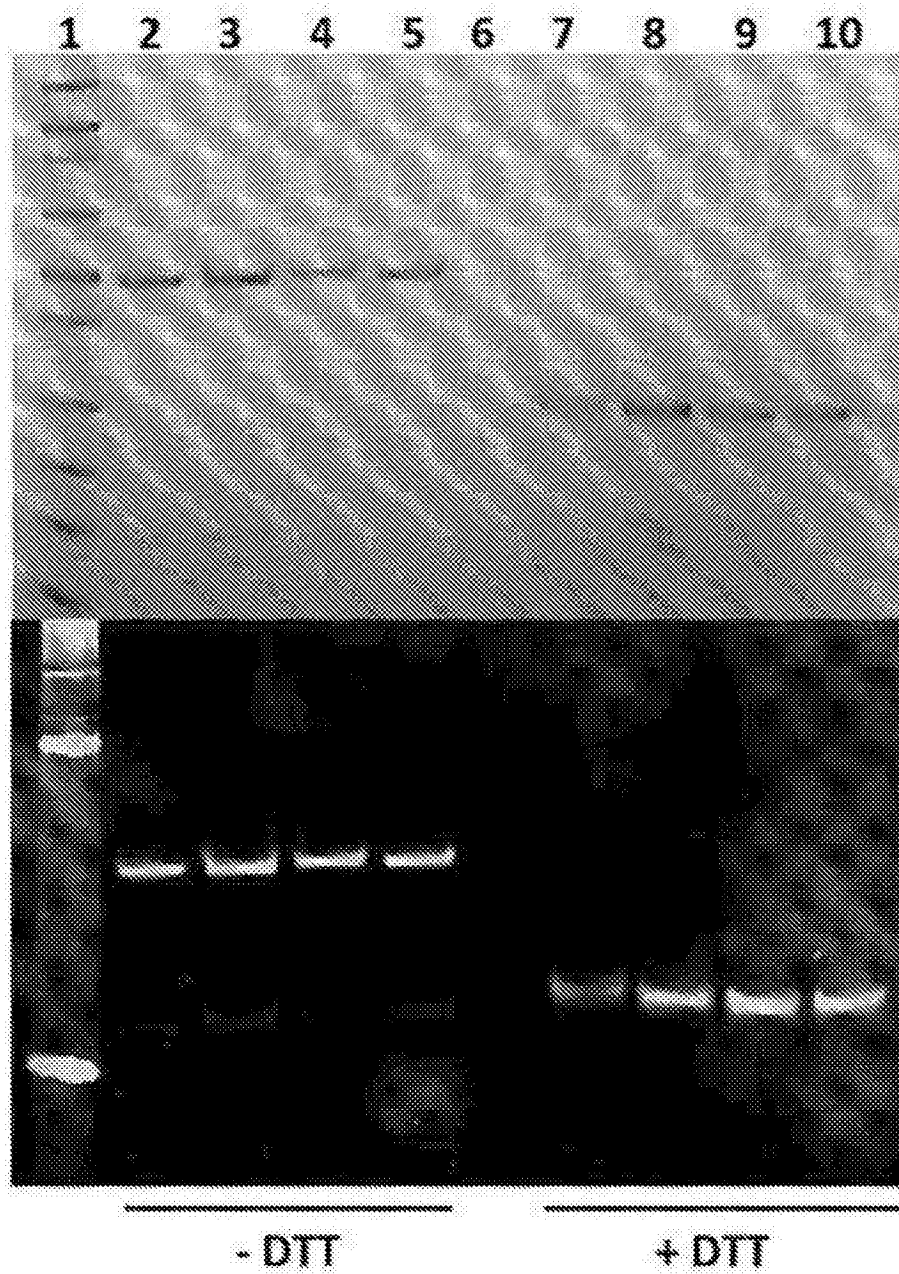


图21

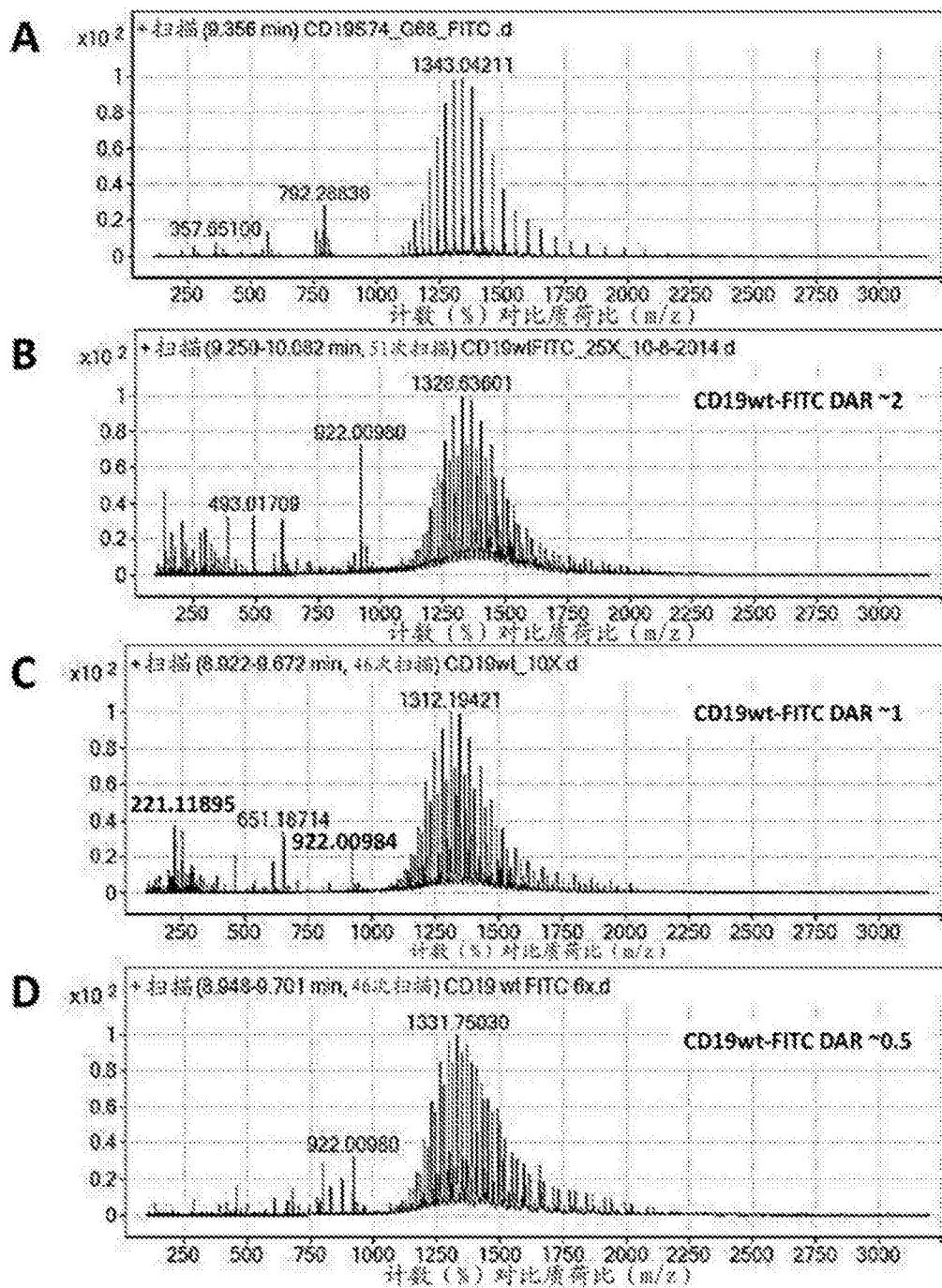


图22A-D

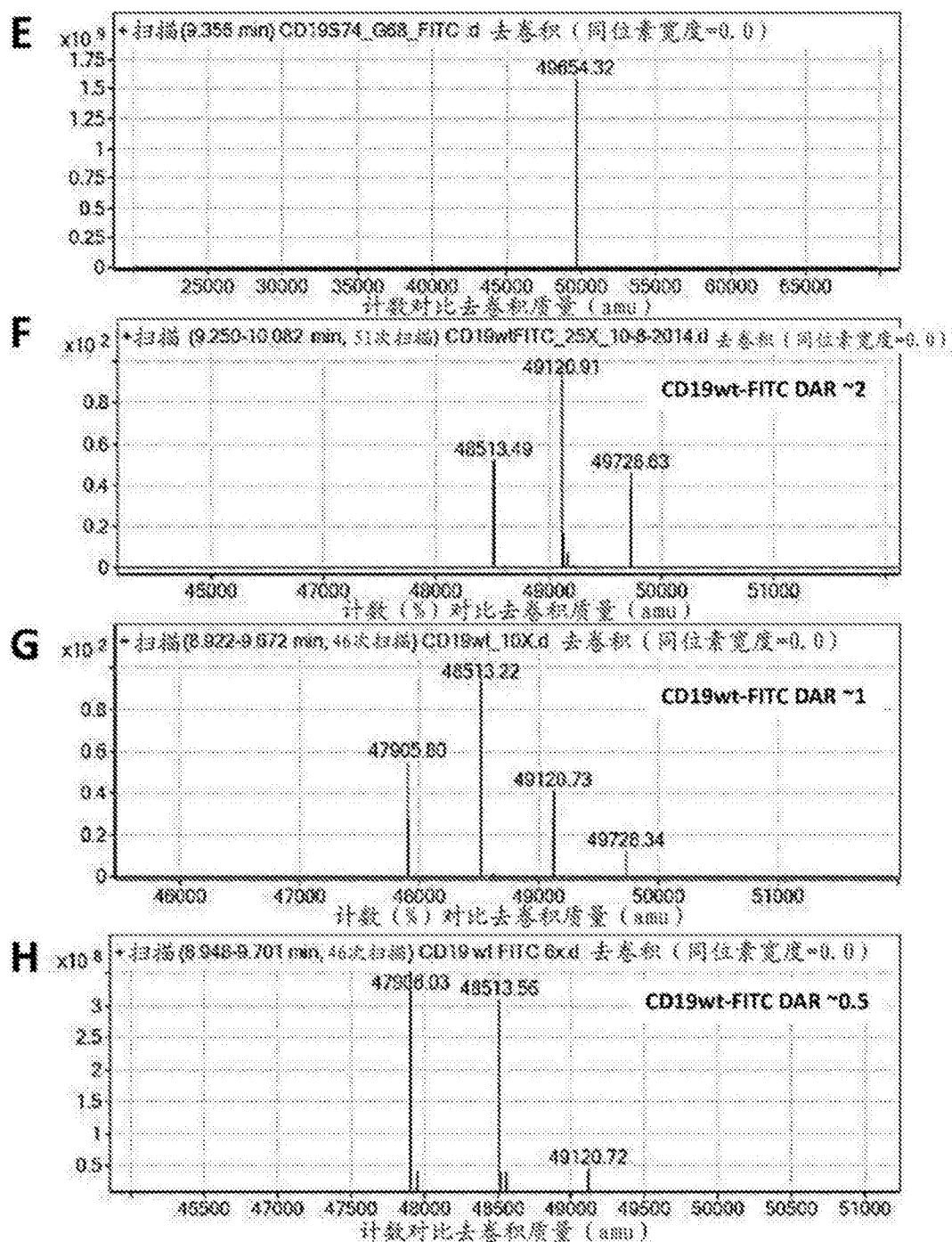


图22E-H