



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116194574 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 30

(21) 申请号 202180057560.9

(22) 申请日 2021.06.09

(30) 优先权数据

2008688.0 2020.06.09 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2021/051435 2021.06.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/250405 EN 2021.12.16

(71) 申请人 UCL商务有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 M·普勒 W-K·张

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 袁悦

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书2页 说明书46页

序列表38页 附图15页

(54) 发明名称

嵌合抗原受体细胞

(57) 摘要

本发明涉及包含嵌合抗原受体(CAR)的细胞,所述嵌合抗原受体包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和编码双特异性蛋白的多核苷酸,所述双特异性蛋白包含结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和结合细胞表面抗原的第二结合结构域。本发明还提供CAR系统、核酸、载体、药物组合物和用于治疗 and/或预防疾病的药物组合物。

1. 细胞,其包含;
 - (i) 嵌合抗原受体(CAR),其包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和
 - (ii) 编码双特异性蛋白的多核苷酸,所述双特异性蛋白包含:
结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和
结合细胞表面抗原的第二结合结构域。
2. 根据权利要求1的细胞,其中所述细胞表面抗原是细胞表面组织抗原。
3. 根据前述权利要求中任一项的细胞,其中所述肿瘤抗原不是细胞表面肿瘤抗原,优选所述肿瘤抗原不包含跨膜结构域;脂质锚,例如糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚。
4. 根据前述权利要求中任一项的细胞,其中所述肿瘤抗原不包含信号肽。
5. 根据前述权利要求中任一项的细胞,其中与相应的非癌性组织相比,所述肿瘤抗原在肿瘤中以更高水平表达,或者其中所述抗原是肿瘤特异性的。
6. 根据前述权利要求中任一项的细胞,其中所述肿瘤抗原的第一或第二表位包含肿瘤特异性突变。
7. 根据权利要求6的细胞,其中所述突变选自取代、插入或缺失。
8. 根据前述权利要求中任一项的细胞,其中所述肿瘤抗原是融合蛋白,适当地所述融合蛋白可以包含至少两个结构域,其中第一结构域包含肿瘤抗原的第一表位且第二结构域包含肿瘤抗原的第二表位。
9. 根据前述权利要求中任一项的细胞,其中所述肿瘤抗原的所述第一或第二表位包含肿瘤特异性翻译后修饰。
10. 根据权利要求9的细胞,其中所述肿瘤特异性翻译后修饰是磷酸化,适当地,所述肿瘤抗原表位之一可以是磷酸化位点。
11. 根据前述权利要求中任一项的细胞,其中:
 - a) 所述CAR的结合结构域结合对于所述肿瘤特异性的肿瘤抗原的第一表位;和/或
 - b) 所述双特异性蛋白的第一结合结构域结合对于所述肿瘤特异性的肿瘤抗原的第二表位。
12. 根据前述权利要求中任一项的细胞,其中所述细胞是免疫效应细胞,例如 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞或巨噬细胞。
13. 核酸构建体,其包含:
 - (i) 编码CAR的第一核酸序列,所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和
 - (ii) 编码双特异性蛋白的第二核酸序列,所述双特异性蛋白包含:
结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和
结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。
14. 根据权利要求13的核酸构建体,其中所述第一和第二核酸序列由共表达位点分隔。
15. 核酸序列的试剂盒,其包含:
 - (i) 编码CAR的第一核酸序列,所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和
 - (ii) 编码双特异性蛋白的第二核酸序列,所述双特异性蛋白包含:
结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和
结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。
16. 载体,其包含根据权利要求13或14的核酸构建体。

17. 载体的试剂盒,其包含:

(i) 包含编码CAR的核酸序列的第一载体,所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和

(ii) 包含编码双特异性蛋白的核酸序列的第二载体,所述双特异性蛋白包含:

结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。

18. 药物组合物,其包含多个根据权利要求1至12中任一项的细胞、根据权利要求13或14的核酸构建体、如权利要求15中定义的第一核酸序列和第二核酸序列;根据权利要求16的载体或如权利要求17中定义的第一和第二载体。

19. 根据权利要求18的药物组合物,其用于治疗 and/或 预防疾病。

20. 根据权利要求19使用的药物组合物,其中所述疾病是癌症。

21. 用于制备根据权利要求1至12中任一项的细胞的方法,所述方法包括将以下引入所述细胞的步骤:根据权利要求13或14的核酸构建体、如权利要求15中定义的第一核酸序列和第二核酸序列;根据权利要求16的载体或如权利要求17中定义的第一和第二载体。

22. CAR系统,其包含:

(i) 受体组分,其包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域、跨膜结构域和信号传导结构域;和

ii) 双特异性蛋白,其包含:

结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。

23. 根据权利要求22的系统,其中所述系统包含:

a) 表达所述受体组分的 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞或巨噬细胞;和/或

b) 表达所述双特异性蛋白的 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞或巨噬细胞;和/或

c) 所述受体组分和所述双特异性蛋白由相同细胞表达和/或

d) 其中所述双特异性蛋白施用于所述系统。

24. 用于与CAR表达细胞组合治疗癌症的双特异性蛋白,其中:

所述双特异性蛋白质包含:

结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域;以及

所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域。

25. 用于与双特异性蛋白组合治疗癌症的CAR表达细胞,其中:

所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;以及

所述双特异性蛋白包含:

结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。

嵌合抗原受体细胞

发明领域

[0001] 本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)和双特异性蛋白,尤其涉及CAR和双特异性蛋白的组合;涉及包含所述CAR并表达所述双特异性蛋白的细胞;尤其涉及使CAR能够靶向通常不存在于细胞的细胞表面的抗原的方法。本发明涉及包含根据本发明的细胞和/或双特异性蛋白的药物组合物及其在治疗和/或预防疾病中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 免疫系统在许多不同类型癌症的发生和发展中发挥着重要作用。正在开发若干不同的免疫治疗策略作为这些癌症的潜在疗法。修饰免疫系统以识别肿瘤细胞和促进抗肿瘤效应物功能的免疫治疗策略包括免疫检查点阻断、使用肿瘤浸润淋巴细胞或表达转基因T细胞受体(TCR)或CAR的遗传修饰T细胞的过继细胞疗法(ACT)。

[0004] 将CAR或转基因TCR引入细胞允许通过将编码CAR或TCR的核酸离体引入外周血细胞(例如,外周血T细胞)生成大量对抗原特异性的细胞。

[0005] CAR是将单克隆抗体的特异性移植到细胞(例如T细胞)上的人工受体,可以通过将抗体重链(VH)和轻链(VL)的可变区连接到单独的细胞内信号链或与其他信号传导部分结合来构建。CAR识别出现在肿瘤细胞表面的抗原。

[0006] CAR T细胞植入患者体内,增殖并定位于疾病部位。CAR T细胞已显示出针对淋巴样恶性肿瘤,包括那些对标准疗法难以治疗的恶性肿瘤的活性。CART细胞的持久性保护免于复发。这些特性共同使CAR T细胞疗法成为极具吸引力的癌症治疗方式。

[0007] 迄今为止,使用CD19靶向CAR T细胞疗法在血液系统恶性肿瘤中取得了最成功的结果,并获得了美国食品和药物管理局(FDA)的商业批准。CAR T细胞也被证明可有效治疗难治性癌症。

[0008] 然而,目前CAR T细胞的一个主要限制是它们不能靶向细胞内抗原,例如,细胞内抗原对于CAR的抗原结合结构域是无法接近的细胞内。这限制了CAR特异性靶向癌症的可能性,因为许多细胞内抗原会发生突变、融合或异常磷酸化事件,这些事件对肿瘤细胞的选择性高于对正常细胞的选择性。已知肿瘤细胞会将细胞内抗原(其中许多包含这些对肿瘤细胞具有高度选择性的突变、融合或异常磷酸化事件)泄漏到肿瘤微环境中。

[0009] 识别细胞内抗原的一种方法是通过使用识别MHC环境中的肽的转基因TCR。例如,识别以下的TCR:来自过表达的蛋白质的肽;或包含点突变的肽;可以生成融合连接点甚至磷表位。

[0010] 然而,转基因TCR有若干局限性。首先,必须针对不同的HLA类型生成转基因TCR。临床研究中描述和测试的几乎所有转基因TCR都受到HLA-A2限制。取决于人群,HLA-A2流行率为40%或更低。其次,肽的呈递完全依赖于加工蛋白质和肽呈递的复杂过程。这意味着有相当大的机会破坏必要的机制。靶向多个表位并不能解决这个相关问题,因为所有肽都依赖于这些途径。使用转基因TCR靶向细胞内抗原的进一步限制是难以产生特异性,并且临床前数据不能预测由于交叉反应引起的毒性。

[0011] 需要靶向细胞内抗原进行免疫治疗的改进方法。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明至少部分基于发明人的认识,即失调的肿瘤细胞会泄漏少量可以使用免疫疗法进行靶向的肿瘤抗原(例如细胞内肿瘤抗原)。例如,由于ER/高尔基体和/或膜运输失调,肿瘤细胞可能会释放少量肿瘤抗原。这些肿瘤抗原被释放到肿瘤周围的微环境中,并以低水平存在。由于这些肿瘤抗原不存在于细胞表面(即不保留在细胞表面上),因此无法用标准CAR靶向它们。它们的低表达水平也可能对有效靶向这些肿瘤抗原进行治疗带来问题。

[0014] 本发明提供了靶向这些在肿瘤微环境中以低水平存在的肿瘤抗原的治疗策略。该策略包括使用以下组合:1)表达CAR的工程化细胞;和2)双特异性蛋白。本发明的说明性实施方案显示于图1-4中。

[0015] 双特异性蛋白包含结合肿瘤微环境中的细胞表面抗原的第一结构域(例如,在肿瘤细胞的细胞表面上);和结合肿瘤抗原的第二结构域。工程化的CAR细胞表达在与双特异性蛋白识别的表位不同的表位处结合肿瘤抗原的CAR。当肿瘤抗原经由与双特异性蛋白的相互作用从肿瘤细胞或邻近细胞释放时,肿瘤抗原积聚在细胞(例如肿瘤细胞)的表面。然后,CAR与被双特异性蛋白拴系的肿瘤抗原结合。将抗原捕获在其表面的靶标细胞被裂解。

[0016] 这种治疗策略可以用于靶向肿瘤抗原,包括但不限于:

[0017] • 肿瘤表达的融合蛋白(例如,其中双特异性蛋白识别并结合一个融合配偶体,并且CAR识别并结合另一个融合配偶体);

[0018] • 包含肿瘤特异性突变的蛋白质(例如,其中双特异性蛋白识别并结合蛋白质的表位,并且CAR识别并结合可以是肿瘤特异性突变的突变(或反之亦然));

[0019] • 在肿瘤中异常磷酸化的蛋白质(例如,其中双特异性蛋白识别并结合蛋白质的表位,并且CAR识别并结合包含异常磷酸化的表位(或反之亦然))。

[0020] 因此,根据本发明的工程化细胞和双特异性蛋白可以提供改进的工程化细胞以用作治疗剂。

[0021] 在一方面,本发明提供了细胞,其包含:

[0022] (i)包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域的CAR;和

[0023] (ii)编码双特异性蛋白的多核苷酸,双特异性蛋白包含:

[0024] 结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

[0025] 结合细胞表面抗原的第二结合结构域。

[0026] 该细胞可以是工程化的免疫效应细胞。

[0027] 双特异性蛋白可以是分泌蛋白。

[0028] 结合肿瘤抗原的第一表位和肿瘤抗原的第二表位的结合结构域可以是非竞争性的。适当地,结合肿瘤抗原的第一表位的CAR的结合结构域和结合肿瘤抗原的第二表位的双特异性蛋白的第一结合结构域可以能够同时结合相同的抗原。

[0029] 细胞表面抗原可以是细胞表面组织抗原。

[0030] 适当地,肿瘤抗原不是细胞表面肿瘤抗原,优选地所述肿瘤抗原不包含跨膜结构域或脂质锚例如糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚。

[0031] 适当地,肿瘤抗原不包含信号肽。

[0032] 与相应的非癌性组织相比,肿瘤抗原在肿瘤中可以以更高的水平表达,或者抗原可以是肿瘤特异性的。

- [0033] 肿瘤抗原的第一和/或第二表位可以包含肿瘤特异性突变。
- [0034] 突变可以选自取代、插入或缺失。
- [0035] 肿瘤抗原可以是融合蛋白。适当地,所述融合蛋白可以包含至少两个结构域,融合蛋白的第一结构域可以包含肿瘤抗原的第一表位,并且融合蛋白的第二结构域可以包含肿瘤抗原的第二表位。换言之,CAR的结合结构域和双特异性蛋白的第一结合结构域结合融合蛋白的不同结构域或构成融合蛋白的不同融合配偶体。
- [0036] 肿瘤抗原的第一或第二表位可以包含肿瘤特异性翻译后修饰。
- [0037] 肿瘤特异性翻译后修饰可以是磷酸化,适当地,肿瘤抗原表位之一可以是磷酸化位点。例如,肿瘤抗原表位之一可以是磷酸化位点(其对肿瘤具有特异性),而第二肿瘤抗原表位可以是不在磷酸化位点处的表位或非肿瘤特异性的表位。
- [0038] CAR的结合结构域可以结合对肿瘤特异性的肿瘤抗原的第一表位。
- [0039] 双特异性蛋白的第一结合结构域可以结合对肿瘤特异性的肿瘤抗原的第二表位。
- [0040] 细胞可以是免疫效应细胞,例如 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞或巨噬细胞。
- [0041] 在另一方面,本发明提供了核酸构建体,其包含:
- [0042] (i) 编码CAR的第一核酸序列,所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和
- [0043] (ii) 编码双特异性蛋白的第二核酸序列,所述双特异性蛋白包含:
- [0044] 结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和
- [0045] 结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。
- [0046] 第一和第二核酸序列可以由共表达位点分开。
- [0047] 在又一方面,本发明提供了核酸序列的试剂盒,其包含:
- [0048] (i) 编码CAR的第一核酸序列,所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和
- [0049] (ii) 编码双特异性蛋白的第二核酸序列,双特异性蛋白包含:
- [0050] 结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和
- [0051] 结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。
- [0052] 在另一方面,本发明提供了包含根据本发明的核酸构建体的载体。
- [0053] 在另一方面,本发明提供了载体的试剂盒,其包含:
- [0054] (i) 包含编码CAR的核酸序列的第一载体,所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和
- [0055] (ii) 包含编码双特异性蛋白的核酸序列的第二载体,所述双特异性蛋白包含:
- [0056] 结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和
- [0057] 结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。
- [0058] 在另一方面,本发明提供药物组合物,其包含多个根据本发明的细胞、根据本发明的核酸构建体、根据本发明的第一核酸序列和第二核酸序列;根据本发明的载体或根据本发明的第一和第二载体。
- [0059] 在另一方面,本发明提供根据本发明的药物组合物,其用于治疗 and/或预防疾病。
- [0060] 该疾病可以是癌症。

[0061] 在又一方面,本发明提供了用于制备根据本发明的细胞的方法,其包括将以下引入细胞的步骤:根据本发明的核酸构建体、根据本发明的第一核酸序列和第二核酸序列;根据本发明的载体或根据本发明的第一和第二载体。

[0062] 在另一方面,本发明提供了CAR系统,其包含:

[0063] (i)受体组分,其包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域、跨膜结构域和信号传导结构域;和

[0064] ii)双特异性蛋白,其包含:

[0065] 结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

[0066] 结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。

[0067] 该系统可以包含工程化免疫效应细胞。例如,细胞可以是 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞或巨噬细胞。适当地,工程化免疫效应细胞可以表达受体组分。

[0068] 该系统可以包含工程化免疫效应细胞。例如,细胞可以是 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞或巨噬细胞。适当地,工程化免疫效应细胞可以表达双特异性蛋白。

[0069] 受体组分和双特异性蛋白可以由相同细胞表达。例如,双特异性蛋白可以由系统或由系统内的组分产生。

[0070] 可以将双特异性蛋白施用于系统。例如,双特异性蛋白可以在系统外产生并随后引入系统。

[0071] 在又一方面,本发明提供了与CAR表达细胞组合用于治疗癌症的双特异性蛋白,其中:

[0072] 双特异性蛋白包含:

[0073] 结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

[0074] 结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域;并且

[0075] CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域。

[0076] 在另一方面,本发明提供了用于与双特异性蛋白组合用于治疗癌症的CAR表达细胞,其中:

[0077] CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;并且

[0078] 双特异性蛋白包含:

[0079] 结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

[0080] 结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。

附图说明

[0081] 图1-显示了本发明的方面的示意图。在图(a)中,肿瘤细胞过表达某些称为肿瘤抗原的抗原。肿瘤细胞例如通过失调的ER/高尔基体和膜运输释放少量的细胞内蛋白质。因此,少量肿瘤抗原存在于细胞外肿瘤微环境中。然而,这些肿瘤抗原不附着在肿瘤细胞膜上,并且以低水平存在,因此不能被通常仅靶向细胞表面抗原的传统的CART细胞靶向。在图(b)中,示意性地显示了本发明的一般概念。根据本发明的CAR T细胞已经被修饰以分泌双特异性蛋白。这种双特异性蛋白包含对也由所讨论的肿瘤表达的表面组织抗原具有特异性

的结合结构域和对不与CAR对所述抗原的识别重叠的肿瘤抗原具有特异性的结合结构域。分泌的双特异性蛋白导致肿瘤抗原在肿瘤细胞表面上的拴系和浓缩,从而允许CAR进行靶向。

[0082] 图2-显示本发明的一个实施方案的示意图,其中肿瘤表达包含至少两个结构域的融合蛋白,例如EML4-ALK、BCR/ABL或任何其他融合蛋白,如表2中列出的那些。双特异性蛋白结合一个融合配偶体并将其在肿瘤细胞表面拴系/扩增。CAR识别另一个融合配偶体。这增加了系统的特异性,因为只有融合蛋白由CAR T细胞扩增和识别。

[0083] 图3-显示了本发明的一个实施方案的示意图,其中肿瘤表达具有肿瘤特异性突变的蛋白质。双特异性蛋白可以结合所讨论的蛋白质的通用表位,并将其在肿瘤细胞表面拴系/扩增,同时CAR特异性识别突变,或反之亦然。这增加了系统的特异性,因为只有突变蛋白由CAR T细胞扩增和识别。

[0084] 图4-显示本发明的一个实施方案的示意图,其中肿瘤表达异常磷酸化的蛋白质。双特异性蛋白可以结合与异常磷酸化位点不同的蛋白质的表位,并且CAR可以特异性识别磷酸化表位,或反之亦然。这增加了系统的特异性,因为只有异常磷酸化的蛋白质由CAR T细胞扩增和识别。

[0085] 图5-显示EXOAMP体外靶向CD33阳性细胞和细胞内eGFP表达细胞。EXOAMP GFP靶向CAR裂解双阳性CD33/eGFP表达靶标并保留单阳性CD33表达靶标。表达CAR;抗CD33 CAR (α CD33g1x-HNG)、抗GFP CAR (α GFP_GBP6-HNG)、阴性对照CD19-CAR (α CD19FMC63) 和非转导(NT);共表达针对GFP/CD33的双特异性结合剂(α GFP-HNG- α CD33串联scFv) 和针对GFP/CD19的不相关双特异性结合剂(α GFP-HNG- α CD19)的效应T细胞以1:1的效应物与靶标比例针对表达CD33的HL60细胞(参见图A)、表达细胞内eGFP蛋白的HL60细胞(3xMYC-XTEN_L-eGFP)(参见图B)和表达细胞内嵌合GFP/BCL-ABL蛋白的HL60细胞(p210.p210_BCR-ABL-3xMYC-XTEN_L-eGFP)(参见图C)共培养。

[0086] 图6-显示通过CD19-CAR和表达靶向GFP/CD19的双特异性蛋白的EXOAMP GFP-CAR和非转导(NT)的T细胞在皮下NOD scid gamma(NSG)小鼠中表达CD19的NALM6细胞和细胞内表达GFP的NALM6细胞的EXOAMP体内靶向。EXOAMP GFP CAR靶向并裂解在NSG小鼠两侧肋腹中双阳性CD19/eGFP表达NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤,同时保留单阳性NALM6肿瘤。图A显示了体内NALM6皮下动物模型的时间线、队列、采样和注射途径的详细信息。NSG小鼠在交替后肋腹注射 0.5×10^6 NALM6和NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤,并在三天后肿瘤内注射 5×10^6 CAR T细胞。肿瘤细胞已被转导萤火虫萤光素酶/糖基磷脂酰肌醇锚定HA标签(Fluc_xRed.2A.HA-GPI),作为经由生物发光成像的在体外和体内肿瘤生长的标志物。图B显示来自D3-21的原始图像,并显示 α CD19-CAR中两种肿瘤的肿瘤控制;和EXOAMP GFP CAR中特异性双阳性NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤控制。该数据在图C中以肿瘤部位的平均辐射进一步绘制,证明仅使用EXOAMP GFP-CAR的特异性肿瘤控制。分别地,左侧的图表示NALM6的特异性肿瘤平均辐射,右侧的图表示NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP的特异性肿瘤平均辐射。线条表示每个受试小鼠/队列的平均读数。

[0087] 图7-显示通过 α CD19-CAR和表达靶向GFP/CD19的双特异性蛋白或靶向GFP/CD33的无关蛋白的EXOAMP GFP-CAR和非转导(NT)T细胞在皮下NOD scid gamma(NSG)小鼠中表达CD19的NALM6细胞和细胞内表达GFP的NALM6细胞的EXOAMP体内靶向。EXOAMP GFP CAR+

GFPxCD19靶向并裂解NSG小鼠两侧胁腹中双阳性CD19/eGFP表达NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤,同时保留单阳性NALM6肿瘤。然而GFP-CAR+GFPxCD33类似于NT T细胞无法控制两种肿瘤。图A显示了体内NALM6皮下动物模型的时间线、队列、取样和注射途径的详细信息。NSG小鼠在交替部位(左后胁腹和右肩)注射 0.5×10^6 NALM6和NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤,并在三天后肿瘤内注射 5×10^6 CAR T细胞。肿瘤细胞已被转导以表达萤火虫萤光素酶/糖基磷脂酰肌醇锚定的HA标签(Fluc_xRed.2A.HA-GPI),作为经由生物发光成像的在体外和体内肿瘤生长的标志物。图B显示来自D3-21的原始图像,并显示 α CD19-CAR中两种肿瘤的肿瘤控制;和EXOAMP GFP CAR中特异性双阳性NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤控制。GFP-CAR_GFPxCD33类似于NT T细胞无法控制两种肿瘤。该数据在图C中以肿瘤部位的平均辐射进一步绘制,证明仅使用EXOAMP GFP-CAR+GFPxCD19进行特异性肿瘤控制。左侧的图表示NALM6的特异性肿瘤平均辐射,右侧的图表示NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP的特异性肿瘤平均辐射。线条表示每个受试小鼠/队列的平均读数。队列2(α CD19_FMC63-HNG)的第一只小鼠由于在D21之前体重减轻而必须被淘汰。

[0088] 图8-显示通过p53特异性ELISA对来自结肠癌细胞系和对照细胞;激活的PBMC和未激活的PBMC的体外细胞上清液测量的细胞外p53蛋白。将 1×10^5 个细胞铺板到96F孔板的200 μ l培养基中,孵育48小时,然后对细胞上清液中的p53蛋白进行定量。p53蛋白可以在5/6的测试结肠癌细胞系中检测到。CL-40和SW1463细胞系表达含有R248Q突变的突变体p53。HT-29表达R273H突变体p53。LS123表达R175H突变体p53。RKO和LS174T表达野生型p53。读数是HT-29、LS123和LS174T细胞的7个生物学重复,CL-40、SW1463、激活和未激活的PBMC的6个生物学重复以及RKO细胞的1个重复。

[0089] 图9-显示了当与靶标结直肠癌细胞HT29(其表达细胞表面EpCAM和细胞外p53突变体R273H)或LS123(其表达细胞表面EpCAM和细胞外p53突变体R175H)一起孵育时,来自T细胞的IL-2细胞因子释放,其中T细胞条形图从左到右:

[0090] 为非转导(NT)细胞;

[0091] 表达抗EpCAM CAR(抗EpCAM_MT110);

[0092] 表达抗CD19 CAR(抗CD19_FM63 CAR);

[0093] 表达泛嗜性(pantropic)p53 CAR并分泌针对EpCAM和突变体p53R175H的双特异性结合剂(aP53_421+BSB_MT110/7B9);

[0094] 表达泛嗜性p53 CAR并分泌针对EpCAM和CD19的双特异性结合剂(aP53_421+BSB_MT110/FMC63)。

[0095] 图10-显示了当与靶标结直肠癌细胞HT29(其表达细胞表面EpCAM和细胞外p53突变体R273H)或LS123(其表达细胞表面EpCAM和细胞外p53突变体R175H)一起孵育时,来自T细胞的IFN γ 细胞因子释放,其中T细胞条形图从左到右:

[0096] 为非转导(NT)细胞;

[0097] 表达抗EpCAM CAR(抗EpCAM_MT110);

[0098] 表达抗CD19 CAR(抗CD19_FM63 CAR);

[0099] 表达泛嗜性p53 CAR并分泌针对EpCAM和突变体p53 R175H的双特异性结合剂(aP53_421+BSB_MT110/7B9);

[0100] 表达泛嗜性p53 CAR并分泌针对EpCAM和CD19的双特异性结合剂(aP53_421+BSB_

MT110/FMC63)。

[0101] 图11-显示了分泌针对EpCAM和突变体p53 R175H(+BSB_MT110/7B9)的泛嗜性p53 CAR(aP53_421)表达T细胞针对表达细胞表面EpCAM并含有突变体p53 R175H的LS123细胞的体外实时细胞毒性。对照效应物包括非转导细胞(NT)和阳性对照CAR抗EpCAM(aEpCAM_MT110)。

[0102] A) 在E:T 4:1比例(CAR:靶标)的共培养物中,对存活的LS123靶标细胞进行超过120小时的实时分析。虚线0.5归一化存活靶标,相对于t=0归一化。

[0103] B) 与相对于t=0归一化的存活靶标相比,LS123靶标细胞达到50%杀伤的小时数。n/a不适用。

[0104] 发明详述

[0105] 嵌合抗原受体(CAR)

[0106] 经典的嵌合抗原受体(CAR)通常是嵌合I型跨膜蛋白,其将细胞外抗原识别结构域(结合剂)连接到细胞内信号传导结构域(胞内结构域)。结合剂通常是衍生自单克隆抗体(mAb)的单链可变片段(scFv),但其可以是基于包含抗体样抗原结合位点的其他形式。间隔物结构域通常用于将结合剂与膜分离,并使结合剂能够以合适的方向定位自身。常用的间隔物结构域是IgG1的Fc。取决于抗原,更小型的间隔物例如来自CD8 α 的茎,或者甚至只是单独的IgG1铰链也可以是足够的。跨膜结构域将蛋白质锚定在细胞膜中并将间隔物连接到胞内结构域。

[0107] 早期的CAR设计具有衍生自Fc ϵ R1的 γ 链或CD3 ζ 的细胞内部分的胞内结构域。因此,这些第一代受体传递了足以引发T细胞杀伤同源靶标细胞但未能完全激活T细胞增殖和存活的免疫信号1。为了克服这个限制,已经构建了复合胞内结构域:T细胞共刺激分子的细胞内部分与CD3 ζ 的细胞内部分融合导致在抗原识别后可以同时传递激活和共刺激信号的第二代受体。最常用的共刺激结构域是CD28的共刺激结构域。这提供了最有效的共刺激信号,即引发T细胞增殖的免疫信号2。还描述了包括TNF受体家族胞内结构域在内的一些受体,例如密切相关的传递生存信号的OX40和41BB。现在已经描述了更有效的第三代CAR,它们具有能够传递激活、增殖和存活信号的胞内结构域。

[0108] 可以使用例如逆转录病毒载体将CAR编码核酸引入细胞,例如免疫效应细胞,如T细胞。可以采用慢病毒载体。这样,可以生成大量的抗原特异性细胞用于过继细胞转移。当CAR结合靶标抗原时,这会导致激活信号传递到其所表达的T细胞。因此,CAR将T细胞的特异性和细胞毒性导向表达靶向抗原的肿瘤细胞。

[0109] 因此,CAR通常包含:(i)抗原结合结构域;(ii)间隔物;(iii)跨膜结构域;和(iii)包含或关联信号传导结构域的细胞内结构域。

[0110] 适当地,根据本发明的CAR可以包含通用形式抗原结合结构域-间隔物-跨膜结构域-信号传导结构域。适当地,根据本发明的CAR可以具有通用形式抗原结合结构域-间隔物-跨膜结构域-信号传导结构域。

[0111] 适当地,根据本发明的CAR可以包含通用形式:抗原结合结构域-CD3。适当地,根据本发明的CAR可以具有通用形式:抗原结合结构域-CD3。

[0112] 结合结构域

[0113] 结合结构域(或抗原结合结构域)是CAR或双特异性蛋白识别和结合抗原的部分。

[0114] 许多结合结构域是本领域已知的,包括那些基于抗体、抗体片段、抗体模拟物和T细胞受体的抗原结合位点的结合结构域。

[0115] 能够结合选定靶标的抗体片段的实例包括Fv、ScFv、F(ab')和F(ab')₂。

[0116] 例如,结合结构域可以包含:单链可变片段(scFv),例如衍生自单克隆抗体的scFv;靶标抗原的天然配体;对靶标具有足够亲和力的肽;单结构域抗体;人工单一结合剂,如Darpin(设计的锚蛋白重复蛋白);或衍生自T细胞受体的单链。

[0117] 结合结构域可以是具有包含至少一个互补决定区(CDR)的抗原结合位点的多肽。结合结构域可以包含3个CDR并具有与结构域抗体(dAb)等同的抗原结合位点。结合结构域可以包含6个CDR并且具有与经典抗体分子的抗原结合位点等同的抗原结合位点。多肽的其余部分可以是提供合适的支架并以合适的方式对其进行展示以使其结合抗原的任何序列。结合结构域可以是免疫球蛋白分子的一部分,例如Fab、F(ab')₂、Fv、单链Fv(ScFv)片段、纳米抗体或单链可变结构域(其可以是具有3个CDR的VH或VL链)。结合结构域可以是非人的、嵌合的、人源化的或完全人的。

[0118] 结合结构域可以包含不是衍生自或基于免疫球蛋白的结合结构域。已经开发了许多“抗体模拟物”设计的重复蛋白(DRP)以利用非抗体多肽的结合能力。此类分子包括锚蛋白或富含亮氨酸的重复蛋白,例如DARPin(设计的锚蛋白重复蛋白)、Anticalins、Avimers和Versabodies。

[0119] 结合结构域可以“特异性结合”本文定义的抗原。如本文所用,“特异性结合”是指结合结构域结合抗原但不结合其他蛋白质,或以较低的亲和力结合其他蛋白质。

[0120] 两个分子,例如抗原结合结构域和抗原之间的结合亲和力可以通过例如解离常数(KD)的测定来定量。KD可以通过测量结合结构域和抗原之间复合物形成和解离的动力学来确定,例如通过表面等离子体共振(SPR)方法(例如Biacore™)。与复合物结合和解离相对应的速率常数分别称为结合速率常数 k_a (或 k_{on})和解离速率常数 k_d (或 k_{off})。KD通过等式 $KD=k_d/k_a$ 与 k_a 和 k_d 关联。

[0121] 与不同分子相互作用相关的结合亲和力,例如不同结合结构域和抗原的结合亲和力的比较,可以通过比较单个结合结构域和抗原的KD值来比较。

[0122] 结合结构域可以包含不基于抗体的抗原结合位点的结构域。例如,抗原结合结构域可以包含基于蛋白质/肽的结构域,其是肿瘤细胞表面受体的可溶性配体(例如可溶性肽,如细胞因子或趋化因子);或膜锚定配体或受体的细胞外结构域,为此结合对对应物在肿瘤细胞上表达。

[0123] 结合结构域可以基于抗原的天然配体。

[0124] 结合结构域可以包含来自组合文库的亲和肽或从头设计的亲和蛋白/肽。

[0125] 能够结合选定靶标的抗体片段包括Fv、ScFv、F(ab')和F(ab')₂。此外,也可以使用经典抗体的替代物,例如“avibodies”、“avimers”、“anticalins”、“纳米抗体”和“DARPin”。

[0126] 在一方面,结合肿瘤抗原的第一表位和肿瘤抗原的第二表位的结合结构域可以是非竞争性的。适当地,结合肿瘤抗原的第一表位的CAR的结合结构域和结合肿瘤抗原的第二表位的双特异性蛋白的第一结合结构域可以能够同时结合相同的抗原。

[0127] 结合合适抗原的各种结合结构域是本领域已知的。例如,下表1-4列出了包含可用

于本发明的结合结构域的示例性商业抗体。

[0128] 表1. 可商购抗体, 其包含结合磷酸抗原, 例如结合包含磷酸残基的表位或结合不同于磷酸表位的表位的结合结构域。

[0129] 表1.

[0130]

抗原	表位; 磷酸残基	抗体克隆	Cat #	供应商
BRAF	T401	EPR2208Y	ab68215	Abcam plc
	S729	EPR2207	ab124794	Abcam plc
	S729	FQS3318	DCABH-1608	Creative Diagnostics
	T401	FQS3319Z	DCABH-9451	Creative Diagnostics
	T401	JJ08-72	MA5-32430	Thermo Fisher Scientific (Life Technologies)
	S445	Ser445	2696S	Cell Signaling Technology, Inc.
	对应于人 BRAF 的区域末端附近残基的肽用作免疫原	RM308	R20328	NSJ Bioreagents

[0131]

Aurora A (AURKA)	针对在人来源的 N 端映射的氨基酸 1-130 产生	C1	sc-398814	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
		A-11	sc-514374	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	针对在人来源的 N 端映射的氨基酸 1-130 产生			
	免疫原是包含 AURKA 的氨基酸 2-110 的部分重组蛋白	6G9	DMABT-H13111	Creative Diagnostics
	T288	C39D8	3079S	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	T288	F.131.2	PIMA51490 4	Thermo Fisher Scientific (Life Technologies)
	T288	95.Thr 288	sc-293126	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

[0132] 表2. 可商购抗体, 其包含结合肿瘤融合蛋白, 例如结合融合配偶体之一上的表位的结合结构域。

[0133] 表2.

[0134]

肿瘤融合	抗原	抗体克隆	Cat #	供应商
EML4-ALK	EML4	W18139A	670801	BioLegend, Inc.
		D7Y8F	12156	Cell Signaling Technology, Inc.
		#2428	2428S	Cell Signaling Technology, Inc.
		2F2	SAB1401649-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
		3C10	WH0027436M1-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
	ALK (CD246)	SP144	ab183332	Abcam plc
		SP8	ab16670	Abcam plc
		5A4	ab17127	Abcam plc
		OTI1A4	UM800118	OriGene Technologies, Inc.
		ALK1	MABC1171-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
		OTI1H7	TA800712	OriGene Technologies, Inc.
		OTI1D9	CF801141	OriGene Technologies, Inc.
CCDC6-RET	CCDC6	5D11	WH0008030M3-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
		Q-23	sc-100309	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
		6E22	CABT-B9907	Creative Diagnostics
	RET	4C3	ABIN6950046	antibodies-online Inc.
		8D10C9	ABIN230698	antibodies-online Inc.
		RET-2663	ABIN6940506	antibodies-online Inc.
		132507	ABIN308572	antibodies-online Inc.
		3F8	ABIN384274	antibodies-online Inc.

[0135]

NCOA4-RET	NCOA4	2H8	ABIN563528	antibodies-online Inc.
		C-4	sc-373739	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
KIF5B-RET	KIF5B	EPR10276(B)	ab167429	Abcam plc

[0136] 表3. 可商购抗体, 其包含结合具有点突变的抗原, 例如结合包含点突变的表位或结合不同于点突变的表位 (称为野生型表位) 的结合结构域。

[0137] 表3.

[0138]

抗原	表位	抗体克隆	Cat #	供应商
TP53	残基 11-25 之间的-N 端表位映射	DO-1	sc-126	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	针对对应于氨基酸残基 371-380 的合成肽产生	Pab421	ab245685	Abcam
	氨基酸 212-217	Pab240	sc-99	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	氨基酸 1-45	DO-7	sc-47698	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	氨基酸 32-79 之间的 N 端	Pab1801	sc-98	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	针对 p53 的 N 端产生	Bp53-12	sc-263	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	针对氨基酸 10-16 产生	DO-2	sc-53394	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	R175H 突变体	XH117	DMAB-DCC108	Creative Diagnostics
	R282W 突变体	XH119	DMAB-DCC109	Creative Diagnostics
KRAS	针对对应于 N 端氨基酸 1-100 的合成肽产生	EP1125Y	ab52939	Abcam plc
	针对氨基酸 1-188 产生	3B10-2F2	WH0003845M1-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
	针对氨基酸 16-125 产生	4F3	SAB1404011-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
	针对氨基酸 54-189 产生	F234	sc-30	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	针对氨基酸 1-186 产生	2F8	NBP2-59413-50ul	Novus Biologicals
	A146T 突变体	XH105	DMAB-DCC097	Creative Diagnostics
	G12D 突变体	XH106	DMAB-DCC098	Creative Diagnostics
	G12S 突变体	XH107	DMAB-DCC099	Creative Diagnostics
	G13A 突变体	XH108	DMAB-DCC100	Creative Diagnostics
	G13D 突变体	XH109	DMAB-DCC101	Creative Diagnostics
	Q61H 突变体	XH110	DMAB-DCC102	Creative Diagnostics
	Q61L 突变体	XH111	DMAB-DCC103	Creative Diagnostics
	Q61R 突变体	XH112	DMAB-DCC104	Creative Diagnostics
	G12D 突变体	D8H7	14429S	Cell Signaling Technology, Inc.
	G12V 突变体	D2H12	14412S	Cell Signaling Technology, Inc.

[0139]

BRAF	针对氨基酸 50-150 产生	EP152Y	ab33899	Abcam plc
	针对氨基酸 346-445 产生	3C6	WH0000673M1-200UL	Sigma-Aldrich Ltd
	针对氨基酸 346-445 产生	3C2	SAB1403617-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
	D594G 突变体	XH015	DMAB-DCC011	Creative Diagnostics
	G469E 突变体	XH016	DMAB-DCC012	Creative Diagnostics
	V600D 突变体	XH018	DMAB-DCC014	Creative Diagnostics
	N581S 突变体	XH017	DMAB-DCC013	Creative Diagnostics
	V600E 突变体	XH019	DMAB-DCC015	Creative Diagnostics
	V600K 突变体	XH020	DMAB-DCC016	Creative Diagnostics
	V600R 突变体	XH021	DMAB-DCC017	Creative Diagnostics
	V600E 突变体	SN9	CABT-BL8457	Creative Diagnostics
	V600E 突变体	RM8	ABIN6560108	antibodies-online Inc.
	V600E 突变体	K21-F	ABIN2207472	antibodies-online Inc.
	针对氨基酸 550-650(包含 V600E 突变)产生	VE1	ab228461	Abcam plc
PIK3CA	针对重组片段产生	4F3	SAB5300225-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
	针对对应于 C 端氨基酸 1000 向前的合成肽产生	EP383Y	ab40776	Abcam plc
	针对氨基酸 959-1068 产生	3G3	WH0005290M1-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
	E542Q	XH095	DMAB-DCC089	Creative Diagnostics
	E542K	XH094	DMAB-DCC088	Creative Diagnostics

[0140] 表4. 可商购抗体, 其包含结合在肿瘤中过表达的抗原的结合结构域。

[0141] 表4.

[0142]

抗原	表位	抗体克隆	Cat	供应商
PRAME	100aa-末端	EPR20330	ab219650	Abcam plc
	126-205aa	D-12	sc-166480	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	126-205aa	H-10	sc-137188	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
生存素(BIRC5)	针对 1-100aa 产生	5B10	WH0000332M1-100UG	Sigma-Aldrich Ltd
	针对 1-142aa 产生	D-8	sc-17779	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	N 端的 2-29aa	C-6	sc-374616	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
	57-67aa	3C184	ABIN2369687	antibodies-online Inc.
WT1	在 N 端附近映射长度为 180 aa 的结构域	F-6	sc-7385	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

[0143]		314-479aa	5G11A5	ABIN5684073	antibodies-online Inc.
		外显子 2 外部	WT1-857	ABIN5590995	antibodies-online Inc.
		外显子 2 外部	WT1-1434R	ABIN5590998	antibodies-online Inc.
		针对对应于氨基酸 1-181aa 的重组蛋白产生	SPM361	ABIN5590992	antibodies-online Inc.
		123-164aa	H-1	sc-393498	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
		针对对应于氨基酸 1-181aa 的重组蛋白产生	6F-H2	ABIN5590990	antibodies-online Inc.
		195-317aa	960525	ABIN5666563	antibodies-online Inc.
	端粒酶逆转录酶(TERT)	靠近 C 端的 1087-1113aa	A-6	sc-393013	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
		针对 900-1130aa 产生	C-12	sc-377511	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
		针对 1029-1132aa 产生	3H2C12	ABIN5542472	antibodies-online Inc.
		针对 1029-1132aa 产生	3H2G9	ABIN5954350	antibodies-online Inc.
		针对 1100-1200aa 产生	1C1	ABIN6950409	antibodies-online Inc.

[0144] 适当地,用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于来自表1-4中列出的可商购抗体的结合结构域。适当地,用于本发明的任何方面的结合结构域可以包含表1-4中列出的任何可商购抗体的结合结构域。

[0145] 在一方面,用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于(或包含)针对突变体p53的抗体。适当地,抗体可以是突变特异性抗体,即抗体结合突变体p53。可用于本发明的示例性抗体描述于W02018074978和Hwang等人,2018,Cell Reports 22,299-312中,它们均通过引用并入本文。在一方面,用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于(或包含)针对包含R175H的突变体p53的抗体。用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于(或包含)对包含R175H的突变体p53特异的抗体。

[0146] 在一方面,用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于(或包含)抗体克隆7B9。

[0147] 在一方面,用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于(或包含)针对包含R248Q的突变体p53的抗体。用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于(或包含)对包含R248Q的突变体p53特异的抗体。示例性抗体描述于W02018074978和Hwang等人,同上。

[0148] 在一方面,用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于(或包含)针对包含R273H的突变体p53的抗体。用于本发明的任何方面的结合结构域可以基于(或包含)对包含R273H的突变体p53特异的抗体。示例性抗体描述于W02018074978和Hwang等人,同上。

[0149] 间隔物结构域

[0150] CAR可以包含间隔物序列以连接结合结构域与跨膜结构域并且在空间上将结合结构域与胞内结构域分开。

[0151] 双特异性蛋白可以包含两个结合结构域之间的间隔物序列。适当地,间隔物序列可以在空间上分隔双特异性蛋白的两个结合结构域。

[0152] 柔性间隔物允许结合结构域定向在不同的方向以促进结合。

[0153] 间隔物序列可以例如包含IgG1 Fc区、IgG1铰链或人CD8茎或小鼠CD8茎。替代性

地,间隔物可以包含与IgG1 Fc区、IgG1铰链或CD8茎具有相似的长度和/或结构域间隔特性的替代接头序列。可以改变人IgG1间隔物以去除Fc结合基序。

[0154] 跨膜结构域

[0155] 跨膜结构域是跨膜的CAR的序列。

[0156] 适当地,CAR可以是单跨蛋白。

[0157] 适当地,CAR可以是多跨蛋白。

[0158] 跨膜结构域可以是在膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。这通常是由若干疏水残基组成的 α 螺旋。任何跨膜蛋白的跨膜结构域均可用于提供本发明的跨膜部分。

[0159] 蛋白质跨膜结构域的存在和跨度可以由本领域技术人员使用生物信息学工具例如TMHMM算法(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测。此外,考虑到蛋白质的跨膜结构域是相对简单的结构,即预测形成长度足以跨膜的疏水性 α 螺旋的多肽序列,也可以使用人工设计的TM结构域(例如,如描述于US 7052906 B1,其通过引用并入本文)。

[0160] 跨膜结构域可以衍生自CD28,其提供了良好的受体稳定性。

[0161] 跨膜结构域可以衍生自TCR受体复合物的组分。

[0162] 跨膜结构域可以衍生自TCR α 链。适当地,跨膜结构域可以包含TCR α 链。

[0163] 跨膜结构域可以衍生自TCR β 链。适当地,跨膜结构域可以包含TCR β 链。

[0164] 跨膜结构域可以衍生自CD3链。适当地,跨膜结构域可以包含CD3链。

[0165] 适当地,跨膜结构域可以衍生自CD3- ϵ 链。适当地,跨膜结构域可以包含CD3- ϵ 链。

[0166] 适当地,跨膜结构域可以衍生自CD3- γ 链。适当地,跨膜结构域可以包含CD3- γ 链。

[0167] 适当地,跨膜结构域可以衍生自CD3- δ 链。适当地,跨膜结构域可以包含CD3- δ 链。

[0168] 适当地,跨膜结构域可以衍生自CD3- ζ 链。适当地,跨膜结构域可以包含CD3- ζ 链。

[0169] 活化胞内结构域

[0170] 胞内结构域是CAR的信号传递部分。其可以是CAR的细胞内结构域的一部分或与之相关。抗原识别后,受体簇、天然CD45和CD148被排除在突触之外,并且信号被传递到细胞。最常用的胞内结构域组分是含有3个ITAM的CD3- ζ 。这会在抗原结合后将激活信号传递给T细胞。CD3- ζ 可能无法提供完全有效的激活信号并可能需要额外的共刺激信号传导。例如,嵌合CD28和OX40可以与CD3- ζ 一起使用以传递增殖/存活信号,或所有三者可以一起使用。

[0171] 当CAR包含活化胞内结构域时,其可以包含单独的CD3- ζ 胞内结构域、CD3- ζ 胞内结构域和CD28或OX40的胞内结构域或者CD28胞内结构域和OX40和CD3- ζ 胞内结构域。

[0172] 任何含有ITAM基序的胞内结构域都可以充当活化胞内结构域。

[0173] 适当地,根据本发明的CAR可以是分离的受体,使得抗原识别结构域是与信号传导结构域分开的蛋白质。

[0174] 活化胞内结构域可以是TCR细胞内结构域。

[0175] 适当地,活化胞内结构域可以包含来自TCR受体复合物的组分的细胞内信号传导结构域的刺激结构域。

[0176] 活化胞内结构域可以衍生自TCR受体复合物的组分。

[0177] 活化胞内结构域可以衍生自CD3链。适当地,活化胞内结构域可以包含CD3链。

[0178] 适当地,活化胞内结构域可以衍生自CD3- ϵ 链。适当地,活化胞内结构域可以包含

CD3- ϵ 链。

[0179] 适当地,跨膜结构域可以衍生自CD3- γ 链。适当地,跨膜结构域可以包含CD3- γ 链。

[0180] 适当地,活化胞内结构域可以衍生自CD3- δ 链。适当地,活化胞内结构域可以包含CD3- δ 链。

[0181] 适当地,活化胞内结构域可以衍生自CD3- ζ 链。适当地,跨膜结构域可以包含CD3- ζ 链。

[0182] 双特异性蛋白

[0183] 如本文所用,“双特异性蛋白”是指包含结合肿瘤抗原的表位的第一结合结构域;和结合细胞表面抗原的第二结合结构域的蛋白质。

[0184] 在一方面,双特异性蛋白位于细胞外空间。双特异性蛋白可以是细胞外蛋白质。例如,双特异性蛋白可以位于肿瘤微环境的细胞外空间。

[0185] 在一方面,双特异性蛋白是分泌蛋白。

[0186] 如本文所用,术语“分泌蛋白”是指在细胞外空间中存在的任何蛋白质。这包括,例如,通过经典分泌途径从细胞分泌的蛋白质和通过非经典(或无前导序列、不常规或非常规)分泌途径从细胞分泌的蛋白质。

[0187] 在一方面,双特异性分泌蛋白通过经典分泌途径从细胞分泌。用于本发明的双特异性蛋白可以包含信号肽,以便当双特异性蛋白在细胞(例如T细胞)中表达时,新生蛋白被引导至内质网并随后引导至细胞表面,于此从细胞中释放。可以使用Signal P和TargetP方法预测经典蛋白质分泌(Nielsen,H.等人,(1997)Protein Eng.,10,1-6;Emanuelsson,O.,Nielsen,H.,Brunak,S.和von Heijne,G.(2000)J.Mol.Biol.,300,1005-1016),其通过引用并入本文。

[0188] 信号肽的长度通常为16到30个氨基酸,通常位于新合成蛋白质的N端。信号肽的核心可以含有一段倾向于形成单个 α 螺旋的疏水性氨基酸(长度约5至约16个氨基酸)。信号肽可以在N端开始,带有一小段带正电的氨基酸,这有助于在易位过程中加强多肽的正确拓扑结构。在信号肽的末端通常有一段由信号肽酶识别和切割的氨基酸。信号肽酶可以在易位期间或完成易位后切割以生成游离信号肽和成熟蛋白。然后,游离信号肽被特定的蛋白酶消化。

[0189] 可以使用的信号肽的实例是:

[0190] METDTLLLWVLLLWVPGSTG(SEQ ID NO:6)

[0191] 在另一方面,双特异性分泌蛋白通过非经典分泌途径从细胞分泌。可以使用SecretomeP 2.0服务器预测非经典蛋白质分泌,J.Dyrløv Bendtsen等人,Protein Eng.Des.Sel.,17(4):349-356,2004(其通过引用并入本文)。可以在没有N端信号肽的情况下分泌的蛋白质的实例包括FGF-1、FGF-2、IL-1和半乳糖凝集素。在一方面,用于本发明的双特异性分泌蛋白不包含N端信号肽。

[0192] 在一方面,双特异性分泌蛋白由细胞,例如免疫效应细胞表达。双特异性分泌蛋白可以由表达受体组分的细胞表达,所述受体组分包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域、跨膜结构域和信号传导结构域。双特异性分泌蛋白可以由表达CAR的细胞表达,所述CAR包含结合如本文所述的肿瘤抗原的第一表位的结合结构域。

[0193] 在一方面,将双特异性蛋白引入或施用至细胞外空间。可以将双特异性蛋白引入或施用至肿瘤微环境中的细胞外空间。例如,双特异性蛋白可以通过注射或通过受试者的全身施用直接引入肿瘤微环境。

[0194] 双特异性蛋白可以是可溶性蛋白。适当地,双特异性蛋白可以是肿瘤微环境的细胞外空间中的可溶性蛋白。

[0195] 如本文所用,“可溶”是指双特异性蛋白能够在肿瘤微环境中移动。

[0196] 适当地,在结合抗原之前,双特异性蛋白可以不直接或间接拴系于细胞表面。因此双特异性蛋白的两个末端都可用于结合抗原。一旦双特异性蛋白与其靶标抗原之一结合,其就会间接地拴系在细胞表面。参见例如图1b)。一旦双特异性蛋白与其两个靶标抗原结合,其就会间接地拴系在包含CAR的细胞和肿瘤细胞的细胞表面。参见例如图1b)。

[0197] 双特异性蛋白的结合结构域可以通过任何合适的方式相互连接。例如,结合结构域可以彼此直接融合。替代性地,双特异性蛋白可以包含结合结构域之间的间隔物或接头。接头提供灵活性,例如,使双特异性蛋白能够结合肿瘤抗原和细胞表面抗原。

[0198] 适当地,间隔物结构域或接头可以在空间上分隔双特异性蛋白的两个结合结构域。接头可以是肽接头。

[0199] 合适的接头肽是本领域已知的。例如,一系列合适的接头肽描述于Chen等人(Adv Drug Deliv Rev.2013October 15;65(10):1357-1369,其通过引用并入本文,具体参见表3)。

[0200] 合适的接头是(SGGGG)_n(SEQ ID NO:7),其包含SEQ ID NO:7的一个或多个拷贝。例如,合适的接头肽显示为SEQ ID NO:8。

[0201] SGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:8)。

[0202] 另一个示例性接头是XTEN接头:SGSETPGTSESATPES(SEQ ID NO:9)

[0203] 用于根据本发明的双特异性结合剂的双特异性蛋白和/或结构域的示例性序列包括:

[0204] aGFP_kub4_VHH-L3-aCD33glx_LH-H6(SEQ ID NO:10):

[0205] METDTLLLWVLLLWVPGSTGQVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVA
GMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSSDPSGGGSGGG
GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYFNLVWYQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQ
YTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTLVTVSSGGGSHHHHHH

[0206] 以上序列中的结构域按顺序为:

[0207] 信号肽

[0208] aGFP_kub4_VHH

[0209] L3丝氨酸-甘氨酸接头

[0210] aCD33glx_LHscFv

[0211] 六组氨酸标签

[0212] aGFP_kub4_VHH-L3-aCD19FMC63_HL-H6(SEQ ID NO:11):

[0213] METDTLLLWVLLLWVPGSTGQVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVA

GMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSSDPSGGGGSGGG
GSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTII
KDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTTSSL
ASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ
QGNTLPYTFGGGKLEITKASGGGGSHHHHHH

[0214] 以上序列中的结构域按顺序为：

[0215] 信号肽

[0216] aGFP_kub4_VHH

[0217] L3丝氨酸-甘氨酸接头

[0218] aCD19FMC63_HL

[0219] 六组氨酸标签

[0220] 示例性双特异性蛋白可以包含如SEQ ID NO:10或11所示的序列或其与SEQ ID NO:10或11中的任一个具有至少80% (例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%) 同一性的变体,前提是变体蛋白能够充当双特异性蛋白。适当地,双特异性蛋白可以包含如上所示的来自SEQ ID NO:10或11或其与SEQ ID NO:10或11中的任一个具有至少80% (例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%) 同一性的变体的一个或多个结构域,前提是变体蛋白能够充当双特异性蛋白。

[0221] 肿瘤抗原

[0222] 表达

[0223] 如本文所用,“肿瘤抗原”是指由肿瘤细胞产生的抗原。

[0224] 在一方面,与相应的非癌性组织相比,肿瘤以更高水平表达肿瘤抗原。

[0225] 适当地,肿瘤抗原可以以比相应的非癌性组织至少高出20%、至少高出30%、至少高出40%、至少高出50%、至少高出60%、至少高出70%、至少高出80%、至少高出90%的水平表达。适当地,肿瘤抗原可以是肿瘤特异性的。

[0226] 如本文所用,“肿瘤特异性”是指抗原在相同谱系的非癌性细胞中不表达或以较低量表达。

[0227] 适当地,与肿瘤相比,肿瘤抗原可以以至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%更低的水平在相同谱系的非癌性细胞中表达。

[0228] 适当地,肿瘤抗原可以不在相应的非癌性组织中表达。表达水平可以计算为对细胞表面组织抗原呈阳性的细胞的百分比,例如通过流式细胞术。可以在取自肿瘤细胞群与取自相应非癌性组织的细胞群或相同谱系的非癌性细胞群之间进行比较。

[0229] 在一方面,肿瘤抗原包含至少一个肿瘤特异性表位。所述肿瘤特异性表位可以由CAR或双特异性蛋白的抗原结合结构域识别。例如,肿瘤特异性的表位可以包含突变、融合结构域或异常的翻译后修饰如磷酸化。

[0230] 在一个实施方案中,当与相同谱系的相应非癌性组织相比时,肿瘤抗原被过表达。

[0231] 适当地,与相同谱系的非癌性细胞相比,“过表达”的肿瘤抗原可以以至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%更高的水平在肿瘤中表达。

[0232] 适当地,肿瘤抗原可以选自:PRAME;生存素;WT1;端粒酶;MDM2;激肽释放酶4和ERG。

[0233] 适当地,肿瘤抗原可以是PRAME;生存素;WT1或端粒酶中的任一个。

[0234] 与这些肿瘤抗原的过表达相关的癌症显示于下表5中。

[0235] 表5.肿瘤抗原和癌症。

过表达/肿瘤抗原	
靶标基因	癌症
PRAME	黑色素瘤、肉瘤、白血病、中枢神经系统(CNS)、肾、卵巢、子宫内膜、肺、头颈、肝、乳腺、肾、前列腺、软组织。
生存素	肉瘤、中枢神经系统、乳腺、颈、结直肠、子宫内膜、胃、头颈、肝、肾、白血病、肺、间皮瘤、黑色素瘤、卵巢、胰、前列腺。
[0236] WT1	肺、乳腺、胃、头颈、结直肠、肉瘤、甲状腺、成神经细胞瘤、白血病、卵巢、子宫内膜、胰腺。
端粒酶	膀胱、肾、肝、黑色素瘤、肉瘤、甲状腺、CNS、乳腺、头颈、白血病、胰腺。
MDM2	肉瘤、乳腺、肺、结直肠、软组织。
激肽释放酶4	前列腺、卵巢。
ERG	前列腺、肉瘤、软组织、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)。

[0237] 定位

[0238] 大多数癌症靶标是不在肿瘤细胞表面表达的蛋白质。在细胞表面存在的蛋白质(例如跨膜蛋白或GPI连接蛋白)可以使用标准CAR进行靶向,但在细胞内部发现的蛋白质不能由标准CAR靶向。本发明能够靶向通常在细胞内存在的蛋白质,从而增加CAR疗法可以修正的肿瘤抗原的数量。

[0239] 在癌症中,肿瘤细胞释放少量细胞内蛋白,例如,通过失调的ER/高尔基体和膜运输,从而向肿瘤微环境释放少量肿瘤抗原。本发明提供了使用这些肿瘤抗原作为CAR疗法靶标的方法,通过使用CAR和根据本发明的双特异性蛋白的组合将它们捕获在细胞表面上。

[0240] 在一方面,肿瘤抗原不是细胞表面肿瘤抗原。

[0241] 如本文所用,“细胞表面肿瘤抗原”是指在细胞表面表达的肿瘤抗原。换言之,细胞表面肿瘤抗原暴露于细胞外空间。

[0242] 适当地,肿瘤抗原不:包含跨膜结构域;或部分跨越磷脂双层,或具有脂质锚,例如糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。

[0243] 在一方面,肿瘤抗原不是分泌蛋白。适当地,肿瘤抗原不包含信号肽。

[0244] 在一方面,肿瘤抗原不是细胞外蛋白。

[0245] 在一方面,肿瘤抗原不是细胞内蛋白。如本文所用,“细胞内蛋白”是指蛋白质在细胞内表达。

[0246] 在一方面,肿瘤抗原是TCR抗原。

[0247] “TCR抗原”是指可以由TCR靶向的任何抗原。例如,肿瘤抗原可以选自:WT1;MAGE;

A3;P53;NY-ESO-1;CEA;MART1;GP100;蛋白酶3;酪氨酸酶;生存素;hTERT或EphA2。

[0248] 在一方面,肿瘤抗原是主要为细胞内蛋白的蛋白质。

[0249] “主要为细胞内蛋白”是指至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%的肿瘤抗原在细胞内,或换言之在细胞内表达。

[0250] 在一方面,肿瘤抗原是主要为来自相同谱系的相应非癌性细胞中的细胞内蛋白的蛋白质。在一方面,肿瘤抗原是主要为肿瘤细胞中的细胞内蛋白的蛋白质。

[0251] 存在多种用于确定蛋白质的亚细胞定位的方法是本领域众所周知的并且包括例如:电子显微镜;共聚焦显微镜;免疫荧光;和带有荧光标记抗体的流式细胞术。

[0252] 突变

[0253] 全基因组分析表明,实体瘤通常含有20-100个突变的蛋白质编码基因(Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA Nature. 2009 Apr 9; 458(7239): 719-24)。其中一部分被认为是负责肿瘤发生或发展的“司机”,而其余部分是不提供选择性生长优势的“乘客”。然而,这两种类型的突变都为靶向肿瘤细胞提供了机会。

[0254] 在一方面,肿瘤抗原包含突变。

[0255] 可以使用本发明靶向的突变的实例可见于Cosmic数据库:<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>(J.Tate等人,COSMIC:the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer:Nucleic Acids Research,Volume 47,issue D1,8January 2019,D941-D947页,其通过引用并入本文)。

[0256] 突变可以是肿瘤特异性突变。

[0257] 适当地,肿瘤抗原的第一或第二表位可以包含肿瘤特异性突变。

[0258] 适当地,突变可以是任何类型的突变,例如突变可以选自取代、插入或缺失。

[0259] 在一个实施方案中,突变可以是点突变。

[0260] 例如,点突变可以存在于以下任何基因中:TP53;KRAS;BRAF;PTEN;BRCA1;BRCA2;ATM;CDKN2A或PIK3CA。

[0261] 适当地,点突变可以存在于以下任何基因中:TP53;KRAS;BRAF或PTEN。适当地,点突变可以存在于TP53中,例如R175H。

[0262] 肿瘤抗原和相关癌症的示例性突变显示于下表6中。

[0263] 表6. 包含突变的肿瘤抗原和相关癌症示例。

[0264]

靶标基因	癌症	突变
TP53	皮肤、肺、乳腺、结直肠、前列腺、胃、肝、颈、头颈、膀胱、胰、卵巢、食道、CNS、白血病、淋巴瘤。	R175H, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C, R282W, Y220C
BRCA1	乳腺、卵巢、结直肠、颈、子宫、胰腺、前列腺。	S1577P
BRCA2	乳腺、卵巢、结直肠、颈、子宫、胰腺、前列腺、胆囊、胃、骨。	G2044V, S2303F

[0265]

ATM	乳腺、白血病、淋巴瘤、肺、脑、胰腺。	R250, R337C, R337H, R3008H, T935R, P2453H, R2832C
KRAS	胰、结直肠、肺、前列腺、皮肤、甲状腺、肝脏、卵巢、子宫内膜、肾脏、CNS、睾丸、白血病/淋巴瘤、膀胱、头颈、乳腺。	G12C, G12R, G12S, G12A, G12D, G12V, G13D, G13C, G13V, Q61H, Q61R, A146T
BRAF	黑色素瘤、结直肠、卵巢、肺、乳腺、肝脏、甲状腺、CNS、前列腺、肾、胰、子宫内膜。	V600E, G469A, G469V, K601E, D594N, D594G, N581S
CDKN2A	皮肤、胰、头颈、肺、卵巢、胃、前列腺。	G101W, V126D, H66R, H83Y, P114L
PIK3CA	胰、结直肠、肺、前列腺、皮肤、甲状腺、肝、卵巢、子宫内膜、肾、脑、睾丸、白血病、膀胱、头颈、乳腺、胃。	H1047R, E545K, E542K, N345K, R88Q, C420R
PTEN	皮肤、肺、乳腺、结直肠、前列腺、胃、肝、颈、头颈、膀胱、胰、卵巢、食道、CNS、白血病、淋巴瘤。	F341V, R130Q, R173C, R130G, R173H

[0266] 融合蛋白

[0267] 当复杂突变(例如染色体易位、串联复制或逆转录转座)产生含有来自两个不同基因的部分编码序列的新编码序列时,就会出现融合蛋白。融合蛋白通常存在于癌性肿瘤细胞中。此类融合蛋白可以作为癌蛋白发挥作用。例如,bcr-abl融合蛋白是众所周知的致癌融合蛋白,被认为是慢性粒细胞白血病(CML)的主要致癌驱动因素。可以使用本发明靶向的融合蛋白的实例可见于Cosmic数据库:<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/fusion> (J.Tate等人,同上,其通过引用并入本文)。

[0268] 在一方面,肿瘤抗原是融合蛋白。

[0269] 适当地,肿瘤抗原可以是融合蛋白并且可以选自:EML4-ALK;CCD6-RET;NCOA4-RET;KIF5B-RET;KIF5B-ALK;TMPRSS2-ERG;EWSR1-FLI1;SYT-SSX;PAX3-FOXO1;TMPRSS2-ETV1或PAX7-FOXO1。

[0270] 适当地,肿瘤抗原可以是融合蛋白并且可以选自:EML4-ALK;CCD6-RET;NCOA4-RET;KIF5B-RET或KIF5B-ALK。

[0271] 适当地,融合蛋白可以包含至少两个结构域。第一结构域可以包含肿瘤抗原的第一表位并且第二结构域可以包含肿瘤抗原的第二表位。例如,每个结合配偶体可以识别融合蛋白的不同融合配偶体。示例性融合蛋白和相关癌症显示于下表7中。

[0272] 表7.融合蛋白作为肿瘤抗原和相关癌症的示例。

[0273]

靶标基因	癌症
EML4- ALK	肺癌、乳腺、结直肠
CCDC6- RET	肺、结直肠、甲状腺、ALL
TMPRSS2- ERG	前列腺、肉瘤、软组织、AML、T-ALL
EWSR1- FLI1	尤因氏肉瘤
NCOA4- RET	肺、乳腺、结直肠
KIF5B- RET	肺
KIF5B- ALK	肺
SYT-SSX	滑膜肉瘤
PAX3- FOXO1	肉瘤、软组织
TMPRSS2- ETV1	前列腺
PAX7- FOXO1	肉瘤、软组织

[0274] 翻译后修饰

[0275] 已知许多细胞过程受蛋白质磷酸化对丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的可逆反应的调节。这种信号转导级联的破坏与许多疾病包括癌症有关。磷酸化在分子水平上的重要性特别涉及癌症发病机制中涉及的信号传导通路。新的磷酸化蛋白质组学技术已经确定了包含翻译后修饰的新生物标志物，这为治疗方法提供了新的靶点。

[0276] 例如，MHC 1类相关磷酸肽是白血病中记忆样免疫的靶标。可以使用本发明靶向的磷酸肽的实例可见于Cobbold等人，Sci Transl Med. 2013 Sep 18; 5(203): 203ra125，其通过引用并入本文。

[0277] 在一方面，肿瘤抗原包含翻译后修饰。

[0278] 翻译后修饰可以是肿瘤特异性的。

[0279] 适当地，肿瘤抗原的第一或第二表位可以包含翻译后修饰。

[0280] 适当地，翻译后修饰可以是任何类型的翻译后修饰，例如其可以是磷酸化。

[0281] 适当地，肿瘤抗原可以包含翻译后修饰并且可以选自：KRAS；BRAF；AuroraA；ERG；PIK3R1；ALK；mTOR；RET；RB1；ABL1；ABL2或ROS1。

[0282] 适当地，肿瘤抗原可以包含翻译后修饰并且可以选自：KRAS；BRAF；AuroraA；ERG或PIK3R1。

[0283] 适当地，肿瘤抗原的第一或第二表位可以包含翻译后位点，例如磷酸化位点。示例

性的磷酸抗原、磷残基和相关的癌症显示于下表8中。

[0284] 表8. 磷酸抗原、磷酸残基和相关癌症。

靶标基因	癌症	磷酸残基
KRAS	胰、结直肠、肺、前列腺、皮肤、甲状腺、肝脏、卵巢、子宫内膜、肾、脑、睾丸、白血病、膀胱、头颈、乳腺、胃。	S181
BRAF	黑色素瘤、结直肠、卵巢、肺、乳腺、肝、甲状腺、CNS、前列腺、肾、胰、子宫内膜。	T599, S602
PIK3R1	胰、结直肠、肺、前列腺、皮肤、甲状腺、肝、卵巢、子宫内膜、肾、脑、睾丸、白血病、膀胱、头颈、乳腺、胃。	Y688
Aurora A	乳腺、卵巢、胰、膀胱、食管/鼻咽、结直肠、胃、前列腺、肝、肾、多发性骨髓瘤。	T288, T287
ALK	肺癌、乳腺、结直肠。	Y1278, Y1282, Y1283, Y1358, Y1507, Y1604
ERG	前列腺、肉瘤、软组织、AML、T-ALL。	S96, S215
mTOR	肺、胃、乳腺、结直肠、肾、膀胱、前列腺、头颈。	S2448, S2481, S1261, T2446
RET	甲状腺、肺、结直肠。	Y900, Y905, Y981, Y1062, Y687, Y928
RB1	皮肤、膀胱、肺、乳腺、骨、头颈、白血病、软组织。	S807, S811
ABL1	慢性粒细胞白血病(CML)	Y177, Y412, Y245
ABL2	乳腺、卵巢、肺。	Y439, Y272
ROS1	肺、子宫内膜、胃、结直肠、胶质母细胞瘤、肾、黑色素瘤	Y591, Y651

[0287] 示例性序列

[0288] 根据本发明使用的示例性序列和/或结构域包括：

[0289] RQR8-2A-aGFP_GBP6-HNG-CD28TM-41BBZ (SEQ ID NO:1)：

[0290] MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLC
SGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
RRVCKCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMETDTLLLWVLLLWVPGSTGDVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAVSP
YIGSRISLGWFRQAPGKVREGVALINSRDGSTYYADTVKGRFTISQGDANTVYLMNSLKPEDTAIYYCAARWGQIT
DIQALAVASFPDWGQGTQVTVSSDPAEPKSPDKTHCPCPKDPKFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRG
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0291] 以上序列中的结构域按顺序为：

[0292] RQR8标志物基因

[0293] 2A

[0294] 信号肽

[0295] aGFP_GBP6

[0296] 铰链接头(HNG)

[0297] CD28跨膜

[0298] 41BB胞内结构域

[0299] CD3Z胞内结构域

[0300] RQR8-2A-aCD19FMC63_LH-HNG-CD28TM-41BBZ (SEQ ID NO:2):

[0301] MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLC
SGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
RRVCKCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMETDTLLLWVLLLVWPGSTGDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRAS
QDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTK
LEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGV
WGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSDPAEPKSP
DKTHTCPPCPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFI IFWVRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0302] 以上序列中的结构域按顺序为:

[0303] RQR8标志物基因

[0304] 2A

[0305] 信号肽

[0306] aCD19FMC63_LH

[0307] 铰链接头(HNG)

[0308] CD28跨膜

[0309] 41BB胞内结构域

[0310] CD3Z胞内结构域

[0311] RQR8-2A-aCD33g1x_LH-HNG-CD28TM-41BBZ (SEQ ID NO:3):

[0312] MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLC
SGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
RRVCKCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMAVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
EDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTK
LEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKLEWVS
SISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGTLLVTVSSMDPAEP
KSPDKTHTCPPCPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFI IFWVRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
FPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0313] 以上序列中的结构域按顺序为:

[0314] RQR8标志物基因

[0315] 2A

[0316] 信号肽

[0317] aCD33g1x_LH

[0318] 铰链接头(HNG)

[0319] CD28跨膜

[0320] 41BB胞内结构域

[0321] CD3Z胞内结构域

[0322] RQR8-2A-aGFP_GBP6-HNG-CD28TM-41BBZ-E2A-aGFP_kub4_VHH-L3-aCD33g1x_LH-H6 (SEQ ID NO:4):

[0323] MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNP^{SLC}SGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNP^{SLC}SGGGGSPAPRPPTPAPT^{IAS}QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR^{RRVCKCPRPVVRAEGRGSL}TCGDVEENPGPMETDTLLLWVLLLVWPGSTGDVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAVSP^{YIGSRISLGWFRQAPGKVREGVALINSRDGSTYYADTVKGRFTISQGDANTVYLQMN}SLKPEDTAIYYCAARWGQIT^{DIQALAVASFPDWGQGTQVT}VSSDPAEPKSPDKTHTCPPCPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRG^{RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC}SCRFPEEEEGGCEL^{RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL}DKR^{RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK}GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRQCT^{NYALLKLAGDVESNP}GPMYRMQLLS^{CI}ALSLALVTNSQVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQA^{PGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMN}SLKPEDTAVYYCNVNVGF^{EYWGQGTQVT}VSSDP^{SGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV}GDRVITITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTNRLADGVPSR^{FSGSGSGTQYTLTISS}LQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGQGTKLEIKRSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSRSEVQLVES^{GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISL}NGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMN^{SLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGT}LVTVSSGGGGSHHHHHH

[0324] 以上序列中的结构域按顺序为:

[0325] RQR8标志物基因

[0326] 2A

[0327] 信号肽

[0328] aGFP_GBP6

[0329] 铰链接头(HNG)

[0330] CD28跨膜

[0331] 41BB胞内结构域

[0332] CD3Z胞内结构域

[0333] E2A

[0334] 信号肽

[0335] aGFP_kub4

[0336] L3丝氨酸-甘氨酸接头

[0337] aCD33g1x_LH

[0338] 六组氨酸标签

[0339] RQR8-2A-aGFP_GBP6-HNG-CD28TM-41BBZ-E2A-aGFP_kub4_VHH-L3-aCD19FMC63_HL-H6 (SEQ ID NO:5):

[0340] MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNP^{SLC}SGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNP^{SLC}SGGGGSPAPRPPTPAPT^{IAS}QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR^{RRVCKCPRPVVRAEGRGSL}TCGDVEENPGPMETDTLLLWVLLLVWPGSTGDVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAVSP

YIGSRISLGWFRQAPGKVREGVALINSRDGSTYYADTVKGRFTISQGDANTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAARWGQIT
DIQALAVASFPDWGQGTQVTVSSDPAEPKSPDKTHTCPPCPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRG
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRQCT
NYALLKLAGDVESNPGPMYRMQLLSICIALSLALVTNSQVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQA
PGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSSDP
SGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNS
ALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ
EDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITKASGGGGSHHHHHH

[0341] 以上序列中的结构域按顺序排列：

[0342] RQR8标志物基因

[0343] 2A

[0344] 信号肽

[0345] aGFP_GBP6

[0346] 铰链接头(HNG)

[0347] CD28跨膜

[0348] 41BB胞内结构域

[0349] CD3Z胞内结构域

[0350] E2A

[0351] 信号肽

[0352] aGFP_kub4

[0353] L3丝氨酸-甘氨酸接头

[0354] aCD19FMC63_HL

[0355] 六组氨酸标签

[0356] 抗-EpCAM_MT110-抗-EpCAM CAR共表达具有抗-EpCAM MT110scFv_LH取向的RQR8标志物基因、IgG1铰链间隔物、CD28TM结构域以及41BB和CD3Z细胞内结构域。

[0357] RQR8-2A-aEpCAM_MT110_LH-HNG-CD28TM-41BBZ (SEQ ID NO:14) MGTSLLCWMALCLL
GADHADACPYSNPSLCSGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTACPYSNPSLCSGGGSPAPRPPTPAPTIASQP
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVRAEGRGSLTTC
GDVEENPGPMETDTLLLWVLLLWVPGSTGELVMTQSPSSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQ
PPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGGSGG
GGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGVKQRPBGHLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTAD
KSSSTAYMQLSSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTITVTVSSDPAEPKSPDKTHTCPPCPKDPKFWVLVVVG
VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0358] 以上序列中的结构域按顺序为：

[0359] RQR8标志物基因

- [0360] 2A
- [0361] 信号肽
- [0362] aEpCAM_MT100_LH
- [0363] 铰链接头(HNG)
- [0364] CD28跨膜
- [0365] 41BB胞内结构域
- [0366] CD3Z胞内结构域
- [0367] aP53_421+BSB_MT110/FMC63-抗p53 CAR共表达具有抗p53 pAb421scFv LH取向的RQR8标志物基因、IgG1铰链间隔物、CD28TM结构域以及41BB和CD3Z细胞内结构域；和靶向EpCAM(MT110_LH)和CD19(FMC63_HL)的带六组氨酸标签的双特异性结合剂。
- [0368] RQR8-2A-aP53_421_LH-HNG-CD28TM-41BBZ-E2A-aEpCAM_MT110_LH-L-aCD19_FMC63_HL-H6[也称为:aP53_421+BSB_MT110/FMC63。]
- [0369] (SEQ ID NO:16)
- [0370] MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLC
SGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
RRVCKCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMETDTLLLWVLLLVWPGSTGDVLTQTPLTSLVTIGQPASISCKSS
QSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYCWQGTSHPLTF
GAGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIMHWVKRPEQGLEWIGWI
DPENGDTHEYAPKFQGGKATMTADTSSNTAYLQLSSLASEDTAVYYCNFYGDALDYWGQGTITVTVSSDPAEPKSPDKTH
TCPPCPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGGHGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPRQCTNYALLKLAGDVESNPGPMYRMQLLSICIALSLALVT
NSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT
DFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCK
ASGYAFTNYWLGWVKRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLR
NWDEPMDYWGQGTITVTVSSGGGGSEVQLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWG
SETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDBTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIQTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS
LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITKASGGGGSHHHHHH
- [0371] 以上序列中的结构域按顺序排列：
- [0372] RQR8标志物基因
- [0373] 2A
- [0374] 信号肽
- [0375] aP53_421_LH
- [0376] 铰链接头(HNG)
- [0377] CD28跨膜
- [0378] 41BB胞内结构域
- [0379] CD3Z胞内结构域
- [0380] E2A

- [0381] 信号肽
- [0382] aEpCAM_MT110_LH
- [0383] L丝氨酸-甘氨酸接头
- [0384] aCD19_FMC63_HL
- [0385] 六组氨酸标签
- [0386] 在本发明的一方面,细胞表面抗原是EpCAM。在本发明的一方面,肿瘤抗原是p53。在一方面,结合结构域结合p53的肿瘤特异性表位,例如p53R175H的肿瘤特异性表位。
- [0387] 在本发明的一方面,细胞表面抗原是EpCAM,肿瘤抗原是p53。
- [0388] 适当地,嵌合抗原受体(CAR)可以包含结合p53的第一表位的结合结构域;和
- [0389] (ii)双特异性蛋白可以包含:
- [0390] 结合p53的第二表位的第一结合结构域;和
- [0391] 结合EpCAM的第二结合结构域。适当地,肿瘤抗原的第一或第二表位包含肿瘤特异性突变,例如p53突变体R175H。
- [0392] 根据本发明使用的示例性序列和结构域包括:
- [0393] aP53_421+BSB_MT110/7B9-抗p53 CAR共表达具有抗p53 pAb421 scFv LH取向的RQR8标志物基因、IgG1铰链间隔物、CD28TM结构域以及41BB和CD3Z细胞内结构域;和靶向EpCAM(MT110_LH)和mutp53 R175H(7B9_HL)的带六组氨酸标签的双特异性结合剂。
- [0394] RQR8-2A-aP53_421_LH-HNG-CD28TM-41BBZ-E2A-aEpCAM_MT110_LH-L-aP53_R175Hmut_7B9_HL-H6[也称为:aP53_421+BSB_MT110/7B9。](SEQ ID NO:15)
- [0395] MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLC
SGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
RRVCKCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMETDTLLLWVLLLVWPGSTGDVLMQTPLTSLVTIGQPASISCKSS
QSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYCWQGTSHPLTF
GAGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHVWKQRPEQGLEWIGWI
DPENGDTHEYAPKFGKATMTADTSSNTAYLQLSSLASEDTAVYYCNFYGDALDYWGQGTITVTVSSDPAEPKSPDKTH
TCPPCPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRQCTNYALLKLAGDVESNPGPMYRMQLLSICIALSLALVT
NSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT
DFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCK
ASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLR
NWDEPMDYWGQGTITVTVSSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWMKQSHGKSLEWIGRINP
YSGGTVYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSDDSAVYYCARWGGDYVTGGGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
DIVMTQSPSSLSVSGGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKSNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFAGSGSGTDF
TLTISVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGGTKLELKRSGGGGSHHHHHH
- [0396] 以上序列中的结构域按顺序为:
- [0397] RQR8标志物基因
- [0398] 2A
- [0399] 信号肽

- [0400] aP53_421_LH
- [0401] 铰链接头(HNG)
- [0402] CD28跨膜
- [0403] 41BB胞内结构域
- [0404] CD3Z胞内结构域
- [0405] E2A
- [0406] 信号肽
- [0407] aEpCAM_MT110_LH
- [0408] L丝氨酸-甘氨酸接头
- [0409] aP53_R175Hmut_7B9_HL
- [0410] 六组氨酸标签

[0411] 用于本发明的示例性氨基酸序列(例如CAR和/或双特异性蛋白)可以包含如SEQ ID NO:1至5或14至16所示的序列,或其与SEQ ID NO:1至5或14至16中的任一个具有至少80%(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%)同一性的变体,前提是变体蛋白能够充当嵌合抗原受体或双特异性蛋白。适当地,用于本发明的氨基酸序列(例如CAR和/或双特异性蛋白)可以包含来自如上SEQ ID NO:1至5或14至16所示或其与SEQ ID NO:1至5或14至16具有至少80%(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%)同一性的变体的一个或多个结构域,前提是变体蛋白能够充当嵌合抗原受体或双特异性蛋白。

[0412] 细胞表面组织抗原

[0413] 如本文所用,术语“细胞表面组织抗原”是指在细胞表面表达的抗原。换言之,至少部分蛋白质暴露于细胞外空间。

[0414] 细胞表面组织抗原可以是质膜蛋白,其具有暴露于细胞外空间或质膜的外质表面的至少部分结构域。

[0415] 细胞表面组织抗原可以是完整的(或内在的)膜蛋白。整合膜蛋白永久附着在膜上,并具有一个或多个嵌入磷脂双层的结构域。通常,完整的膜蛋白具有带有疏水侧链的残基,这些侧链与膜磷脂的脂肪酰基相互作用,将蛋白质固定在膜上。整合膜蛋白的实例包括转运蛋白、通道、受体和细胞黏附蛋白。

[0416] 细胞表面组织抗原可以是跨膜蛋白。跨膜蛋白跨越脂质双层。跨膜蛋白可以是单次或多次膜蛋白。例如,跨膜蛋白可以是免疫球蛋白超家族的成员。细胞表面蛋白可以是完整的单向蛋白。完整的单向性蛋白与脂质双层的一侧缔合,并且不跨越脂质双层。

[0417] 细胞表面蛋白可以是外周(或外在)膜蛋白。外周膜蛋白不与磷脂双层的疏水核心相互作用。外周膜蛋白通常通过与完整膜蛋白的相互作用间接或与脂质极性头基团的相互作用直接结合到膜上。外周蛋白可以位于质膜的外(外质)表面。细胞表面蛋白可以是外周外质膜蛋白。

[0418] 细胞表面组织抗原可以锚定到质膜,例如共价附接到嵌入细胞膜内的脂质(例如经由糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚)。

[0419] 细胞表面膜蛋白可以是GPI锚定蛋白。

[0420] 存在多种用于确定蛋白质的亚细胞定位的方法是本领域众所周知的并且包括例如:电子显微镜;使用表面生物素化或与已知膜蛋白的共定位的共聚焦显微镜;免疫荧光;

和带有荧光标记抗体的流式细胞术。

[0421] 细胞表面组织抗原在肿瘤微环境中表达。适当地,细胞表面组织抗原可以在肿瘤细胞上表达。适当地,细胞表面组织抗原可以由肿瘤微环境中除肿瘤细胞之外的细胞表达。例如,细胞表面组织抗原可以在肿瘤微环境中本身不是肿瘤细胞的细胞上表达。例如,细胞表面组织抗原可以在肿瘤微环境中的血管(例如肿瘤相关内皮细胞)、基质细胞、免疫细胞、肿瘤相关巨噬细胞、成纤维细胞上表达。

[0422] 细胞表面组织抗原可以由肿瘤细胞和相同谱系的非癌性细胞表达。

[0423] 细胞表面表达可以使用本领域已知的任何方法来确定,例如通过流式细胞术使用适当的同种型匹配对照来确定,这有助于将非特异性背景信号与特异性抗体信号区分开来。

[0424] 细胞表面抗原使双特异性蛋白能够在肿瘤微环境中积累。细胞表面抗原可以是可用于靶向治疗实体癌的任何抗原。

[0425] 细胞表面抗原可以是上皮抗原。例如,细胞表面抗原可以是泛上皮抗原、泛神经胶质抗原、泛肺抗原、泛肠粘膜抗原、泛乳腺上皮抗原、泛卵巢抗原。

[0426] 可用于本发明的示例性上皮抗原列于下表8中。适当地,根据本发明的任何方面的双特异性蛋白可以包含结合结构域,其结合下表9中列出的任何上皮抗原。

[0427] 表9. 示例性上皮细胞表面抗原。

靶标	组织表达
CD326 (EpCAM)	泛上皮细胞标志物
EGFR (ErbB-1, HER1)	肺、乳腺、CNS、前列腺、胃、胎盘、结直肠、胰、神经内分泌、卵巢。
CD227 (MUC1, EMA)	乳腺、食道、胃、结直肠、胰、前列腺、肺、卵巢。
GPA33	结直肠。
TACSTD2 (GA733-1, TROP-2, EGP-1)	上皮细胞标志物
EMP2	脑、肝、前列腺、卵巢、神经内分泌、心、肺、胃、胰。
CD324 (E-钙黏蛋白, CHD1)	泛上皮标志物
P-钙黏蛋白(CDH3)	泛复层上皮标志物
CD325 (N-钙黏蛋白, CDH2)	神经内分泌、胰、肝、子宫内膜、子宫、卵巢、胃、CNS。
CD66e (CEA)	胃、泌尿生殖系统、肺、结直肠、食道。
CD44; CD44s, CD44v6, CD44v4-10, CD44v8-10	CNS、神经内分泌、卵巢、睾丸、肾、肝、心、肺、结直肠癌、胃、胰。
整合素, 包括 CD49f(整合素 alpha-6)	CNS、神经内分泌、卵巢、睾丸、肾、肝、心、肺、结直肠癌、胃、胰。
CD340 (ErbB-2, HER2)	乳腺、卵巢、胃、结直肠、胰、子宫内膜、肺、肾、肝脏、皮肤。
HER3 (ErbB-3)	CNS、卵巢、睾丸、肾、肝、心、乳腺、肺、结直肠、内分泌、胃。
HER4 (ErbB-4)	CNS、睾丸、肾、心、肺、胃、泌尿生殖系统。

[0429]	CD10	神经内分泌、子宫内膜、泌尿生殖系统、肝、肾、脑、乳腺、结直肠、胃、卵巢、胎盘、前列腺。
	ENaC-A (SCNN1A)	肾、肺、唾液腺、皮肤、结肠、胎盘。
	ENaC-B (SCNN1B)	肾、肺、唾液腺、皮肤、结肠、胎盘。
	ENaC-G (SCNN1G)	肾、肺、唾液腺、皮肤、结肠、胎盘。
	ENaC-D (SCNN1D)	肾、肺、神经内分泌、CNS。
	CD118 (LIFR)	肝、胎盘、CNS、皮肤、肺、胃、前列腺、卵巢、神经内分泌、睾丸、胰、结直肠、食道、心。
	PSMA	前列腺、泌尿生殖系统、胃肠道、肾、肝。
	PSCA	前列腺、泌尿生殖系统、胃肠道、肾、肝、食道、皮肤、胎盘。
	STEAP1	前列腺、肺、乳腺、胰、泌尿生殖系统、卵巢、胃、膀胱、结直肠。
	CD331 (FGFR1)	胃、CNS、脑、肾、胎盘、神经内分泌、肺、结直肠、肝、胰、泌尿生殖系统。
	CD332 (FGFR2)	胃、CNS、脑、肾、胎盘、神经内分泌、肺、结直肠、肝、胰、泌尿生殖系统。
	CD333 (FGFR3)	胃、CNS、脑、肾、胎盘、神经内分泌、肺、结直肠、肝、胰、泌尿生殖系统。
	CD334 (FGFR4)	胃、CNS、脑、肾、胎盘、神经内分泌、肺、结直肠、肝、胰、泌尿生殖系统、乳腺、宫颈。
	CD166 (ALCAM)	神经内分泌、CNS、肺、膀胱、胰、胃、泌尿生殖系统、肾、睾丸、前列腺、乳腺、子宫内膜、宫颈。
	间皮素	肺、卵巢、胰。
	EPHA2	CNS、肺、神经内分泌、结肠、泌尿生殖系统、子宫、睾丸、前列腺、胃、食道、子宫内膜、宫颈、胰、肾、肝。
	CD24	肺、乳腺、CNS、神经内分泌、肾、结直肠、膀胱、食道、卵巢、前列腺。
	密蛋白-7	肾、肺、结直肠、胰腺、泌尿生殖系统、肝、膀胱、神经内分泌。

[0430] 在一些方面,细胞表面组织抗原可以是例如:分化簇(CD)蛋白;细胞黏附或细胞连接蛋白;G蛋白偶联受体;溶质载体家族成员和四跨膜蛋白。细胞表面组织抗原可以是免疫球蛋白超家族的成员。

[0431] 细胞表面抗原可以是分化(CD)蛋白簇。CD命名法已用于鉴定和研究为细胞免疫分型提供靶标的细胞表面分子。

[0432] 例如,细胞表面抗原可以选自:

[0433] CD19、CD20、CD45、CD38或CD22(通常由B细胞表达);

[0434] CD33(通常由髓系细胞表达);

[0435] CD2或CD5(通常由T细胞表达);

[0436] CD34或CD117(通常由干细胞表达);

[0437] CD69(通常由活化细胞表达);和

[0438] CD31(通常由内皮细胞、血小板、巨噬细胞、粒细胞和淋巴细胞表达)。

[0439] 在一方面,细胞表面抗原是CD326(EpCAM)。上皮细胞黏附分子是介导上皮细胞中Ca²⁺非依赖性同型细胞-细胞黏附的跨膜糖蛋白。EpCAM还在细胞信号传导、迁移、增殖和分化中发挥作用,并在上皮细胞和上皮衍生的肿瘤中表达。

[0440] 细胞表面组织抗原可以是CD19。CD19是属于免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白,广泛表达于B细胞发育直至终末分化为浆细胞的所有阶段。CD19也在赘生性B细胞的表面表

达,例如其在大多数急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)和B细胞淋巴瘤中以正常至高水平表达。

[0441] 许多识别和结合细胞表面组织抗原的结合结构域是可用的。例如,Naddafi和Davami *Int J Mol Cell Med.*2015Summer;4(3):143-151报告了用于治疗淋巴瘤的新方法的抗CD19单克隆抗体。

[0442] 例如,博纳吐单抗(Blinatumomab)是包含CD19结合结构域和CD3结合结构域的双特异性T细胞接合剂(scFv);SAR3419是抗体-药物缀合物;MOR-208是Fc工程化抗体,MEDI-551是乙二醇工程化抗体。

[0443] 细胞表面组织抗原可以是CD33。CD33是在骨髓谱系细胞上表达的跨膜受体。其结合唾液酸,是免疫球蛋白超家族中SIGLEC凝集素家族的成员。CD33通过结合包含唾液酸残基的分子来刺激。唾液酸残基的结合导致CD33胞质部分上基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)磷酸化,其中CD33作为Src同源(SH2)结构域的停靠位点含有SHP磷酸酶等蛋白质。这种通过CD33的信号传导级联抑制吞噬作用。识别和结合CD33的结合结构域是本领域已知的。例如,伐达妥昔单抗他立林(vadastuximab talirine)和吉妥珠单抗奥唑米星(gemtuzumab ozogamicin)是靶向CD33的用于治疗急性髓性白血病的抗体-药物缀合物。

[0444] 在一些方面,细胞表面组织抗原可能对肿瘤特异。如本文所用,“对肿瘤特异”是指抗原在相同谱系的非癌性细胞中不表达或以较低量表达。

[0445] 适当地,与肿瘤相比,细胞表面组织抗原可以以至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%更低的水平在相同谱系的非癌性细胞中表达。

[0446] 表达水平可以计算为对细胞表面组织抗原呈阳性的细胞的百分比,例如通过流式细胞术。比较可以在取自肿瘤细胞群与取自相应非癌性组织的细胞群或相同谱系的非癌性细胞群之间进行。

[0447] 核酸

[0448] 如本文所用,术语“引入”是指将外源DNA或RNA插入细胞的方法。如本文所用,引入的术语包括转导和转染方法。转染是通过非病毒方法将核酸引入细胞的过程。转导是通过病毒载体将外源DNA或RNA引入细胞的过程。

[0449] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“核酸”旨在彼此同义。核酸序列可以是任何合适类型的核苷酸序列,例如合成的RNA/DNA序列、cDNA序列或部分基因组DNA序列。

[0450] 如本文所用,术语“多肽”在正常意义上使用是指一系列残基,通常是L-氨基酸,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羧基之间的肽键彼此连接。该术语与“蛋白质”同义。

[0451] 技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸和核酸可以编码相同的多肽。此外,应当理解,技术人员可以使用常规技术进行不影响由本文所述的多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸置换,以反映多肽将在其中表达的任何特定宿主生物体的密码子使用。

[0452] 本发明提供了编码根据本发明的CAR的多核苷酸。本发明提供编码根据本发明的双特异性蛋白的多核苷酸。适当地,多核苷酸可以编码根据本发明的CAR和双特异性蛋白。

[0453] 编码根据本发明的CAR和/或双特异性蛋白的核酸可以包括DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。它们也可以是其中包括合成或修饰的核苷酸的多核苷酸。许多不同类型的

寡核苷酸修饰是本领域已知的。这些包括甲基膦酸酯和硫代膦酸酯骨架,在分子的3'和/或5'末端添加吡啶或聚赖氨酸链。出于本文所述用途的目的,应理解可以通过本领域可用的任何方法修饰多核苷酸。可以进行此类修饰以增强感兴趣的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0454] 多核苷酸可以是分离的或重组的形式。其可以掺入载体中并且该载体可以掺入宿主细胞中。此类载体和合适的宿主构成了本发明的又一方面。

[0455] 编码根据本发明的CAR和/或双特异性蛋白的多核苷酸可以是密码子优化的。不同的细胞对特定密码子的使用不同。这种密码子偏倚对应于细胞类型中特定tRNA相对丰度的偏倚。

[0456] 通过改变序列中的密码子,使其与相应tRNA的相对丰度相匹配,可以增加表达。适当地,多核苷酸可以是针对在鼠类疾病模型中表达的密码子优化的。适当地,多核苷酸可以是针对在人受试者中的表达的密码子优化的。

[0457] 许多病毒,包括HIV和其他慢病毒,使用大量稀有密码子,通过改变这些密码子以对应于常用的哺乳动物密码子,可以实现包装组分在哺乳动物生产细胞中的表达增加。哺乳动物细胞以及多种其他生物的密码子使用表在本领域中是已知的。

[0458] 密码子优化还可以涉及去除mRNA不稳定基序和隐蔽剪接位点。

[0459] 适当地,多核苷酸可以包含使编码CAR的核酸序列和编码双特异性蛋白的核酸序列能够从相同的mRNA转录物表达的核酸序列。

[0460] 例如,多核苷酸可以在编码CAR和双特异性蛋白的核酸序列之间包含内部核糖体进入位点(IRES)。IRES是允许在mRNA序列中间开始翻译的核苷酸序列。

[0461] 内部自切割序列可以是能够使包含CAR的多肽和包含双特异性蛋白的多肽分离的任何序列。

[0462] 切割位点可以是自切割的,使得当多肽产生时,立即被切割成单独的肽而不需要任何外部切割活性。

[0463] 为方便起见,本文使用术语“切割”,但切割位点可能导致肽通过经典切割以外的机制分离成单独的实体。例如,对于口蹄疫病毒(FMDV)2A自切割肽,已经提出了各种模型来解释“切割”活性:宿主细胞蛋白酶的蛋白水解、自身蛋白水解或翻译效应(Donnelly等人,(2001)J.Gen.Virol.82:1027-1041,通过引用并入本文)。这种“切割”的确切机制对于本发明的目的并不重要,只要切割位点在位于编码蛋白质的核酸序列之间时导致蛋白质作为单独的实体表达即可。

[0464] 自切割肽可以是来自口疮病毒或心病毒的2A自切割肽。

[0465] 本发明提供了包含编码根据本发明的CAR和/或双特异性蛋白的核酸序列的核酸构建体。

[0466] 载体

[0467] 本发明还提供了包含编码如本文所述的CAR和/或双特异性蛋白的核苷酸序列的载体。

[0468] 适当地,该载体可以包含编码本发明的CAR的核苷酸序列。

[0469] 适当地,该载体可以包含编码本发明的双特异性蛋白的核苷酸序列。

[0470] 在一方面,提供了载体试剂盒,其包含一个或多个本发明的核酸序列,例如编码CAR的核酸和编码本发明的双特异性蛋白的核酸。

[0471] 如本文所用,术语“载体”包括表达载体,即能够表达根据本发明的CAR和/或双特异性蛋白的构建体。

[0472] 适当地,表达载体能够表达根据本发明的CAR和/或双特异性蛋白。

[0473] 在一些实施方案中,载体是克隆载体。

[0474] 合适的载体可以包括但不限于质粒、病毒载体、转座子、与多肽复合或固定在固相颗粒上的核酸。

[0475] 病毒递送系统包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体。

[0476] 逆转录病毒是生命周期不同于裂解病毒的RNA病毒。在这方面,逆转录病毒是通过DNA中间体复制的感染性实体。当逆转录病毒感染细胞时,其基因组通过逆转录酶转化为DNA形式。DNA拷贝作为模板用于产生新的RNA基因组和病毒编码的蛋白质,这些蛋白质是感染性病毒颗粒组装所必需的。

[0477] 存在多种逆转录病毒,例如鼠白血病病毒(MLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、藤波肉瘤病毒(FuSV)、莫洛尼鼠白血病病毒(Mo-MLV)、FBR鼠骨肉瘤病毒(FBR MSV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(Mo-MSV)、Abelson鼠白血病病毒(A-MLV)、禽髓细胞瘤病毒29(MC29)和禽成红细胞增多症病毒(AEV)和所有其他逆转录病毒亚科,包括慢病毒。

[0478] 逆转录病毒的详细列表可见于Coffin等人, (“Retroviruses”1997Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds:JM Coffin,SM Hughes,HE Varmus pp 758-763),通过引用并入本文。

[0479] 慢病毒也属于逆转录病毒家族,但它们可以感染分裂和非分裂细胞(Lewis等人,(1992)EMBO J.3053-3058),通过引用并入本文。

[0480] 载体可以能够将本发明的多核苷酸转移至细胞,例如本文定义的宿主细胞。理想情况下,载体应能够在宿主细胞中持续高水平表达,以便VH和/或VL结构域在宿主细胞中适当表达。

[0481] 载体可以是逆转录病毒载体。载体可以基于或衍生自MP71载体骨架。载体可以缺少土拨鼠肝炎反应元件(WPRE)的全长或截短形式。

[0482] 为了有效感染人细胞,病毒颗粒可以用兼嗜性包膜或长臂猿白血病病毒包膜包装。

[0483] 细胞

[0484] 本发明还提供了包含根据本发明的CAR和/或双特异性蛋白的工程化细胞。在一方面,工程化细胞可以包含编码根据本发明的CAR的多核苷酸或载体。在一方面,工程化细胞可以包含编码根据本发明的双特异性蛋白的多核苷酸或载体。

[0485] 工程化细胞可以是可用于表达和产生根据本发明的CAR和/或双特异性蛋白的任何细胞。

[0486] 适当地,细胞可以是免疫效应细胞。

[0487] 如本文所用,“免疫效应细胞”是对刺激作出应答并引起变化的细胞,即细胞对刺激作出反应。免疫效应细胞可以包括 α/β T细胞、 γ/δ T细胞、自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞。

[0488] 适当地,细胞可以是 α/β T细胞。

- [0489] 适当地,细胞可以是 γ/δ T细胞。
- [0490] 适当地,细胞可以是T细胞,例如溶细胞性T细胞,例如CD8+T细胞。
- [0491] 适当地,细胞可以是NK细胞,例如溶细胞性NK细胞。
- [0492] 适当地,细胞可以是巨噬细胞。
- [0493] 在一方面,细胞可以分离自从受试者获得的血液。适当地,细胞可以分离自从受试者获得的外周血单核细胞(PBMC)。
- [0494] 在一方面,细胞可以是干细胞。
- [0495] 在另一方面,细胞可以是祖细胞。
- [0496] 如本文所用,术语“干细胞”是指能够无限期地产生更多相同类型的干细胞的未分化细胞,并且可以通过分化从中产生其他特化细胞。干细胞是多能的。干细胞可以是例如胚胎干细胞或成体干细胞。
- [0497] 如本文所用,术语“祖细胞”是指能够分化形成一种或多种类型的细胞但在体外自我更新有限的细胞。
- [0498] 适当地,细胞可以能够分化成T细胞。
- [0499] 适当地,细胞可以能够分化成NK细胞。
- [0500] 适当地,细胞可以能够分化成巨噬细胞。
- [0501] 适当地,细胞可以是胚胎干细胞(ESC)。适当地,细胞是造血干细胞或造血祖细胞。适当地,细胞是诱导多能干细胞(iPSC)。适当地,细胞可以从脐带血中获得。适当地,细胞可以从成人外周血中获得。
- [0502] 在一些方面,造血干细胞和祖细胞(HSPC)可以从脐带血中获得。可以根据本领域已知的技术收集脐带血(例如美国专利号7,147,626和7,131,958,其通过引用并入本文)。
- [0503] 在一方面,HSPC可获自多能干细胞来源,例如诱导多能干细胞(iPSC)和胚胎干细胞(ESC)。
- [0504] 如本文所用,术语“造血干细胞和祖细胞”或“HSPC”指表达抗原标志物CD34 (CD34+)的细胞和此类细胞群。在特定实施方案中,术语“HSPC”是指通过抗原标志物CD34 (CD34+)的存在和谱系(lin)标志物的不存在而鉴定的细胞。包含CD34+和/或Lin(-)细胞的细胞群包括造血干细胞和造血祖细胞。
- [0505] HSPC可以从成年人的骨髓,包括股骨、髌部、肋骨、胸骨和其他骨骼中获得或分离。可以使用针头和注射器直接从髌部获取或分离含有HSPC的骨髓抽吸物。HSPC的其他来源包括脐带血、胎盘血、动员外周血、华顿氏胶质、胎盘、胎血、胎肝或胎脾。在特定实施方案中,收获足够量的HSPC用于治疗应用可能需要动员受试者体内的干细胞和祖细胞。
- [0506] 如本文所用,术语“诱导多能干细胞”或“iPSC”是指已被重编程为多能状态的非多能细胞。一旦受试者的细胞已被重编程为多能状态,则可以将细胞编程为期望的细胞类型,例如造血干细胞或祖细胞(分别为HSC和HPC)。
- [0507] 如本文所用,术语“重编程”是指将细胞的潜能增加至较低分化状态的方法。
- [0508] 如本文所用,术语“编程”是指降低细胞潜能或使细胞分化至更分化状态的方法。
- [0509] 适当地,细胞与受试者匹配或是受试者自体的。细胞可以从患者自身的外周血(第1方)或在造血干细胞移植的环境中从供体外周血(第2方)或未连接的供体的外周血(第3方)中离体产生。

[0510] 适当地,细胞可以是受试者自体的。

[0511] 在一些方面,细胞可以衍生自可诱导祖细胞或胚胎祖细胞离体分化为免疫细胞。在这些情况下,通过包括用病毒载体转导、用DNA或RNA转染的任何方法之一引入编码本发明CAR的DNA或RNA来产生细胞。

[0512] 组合物

[0513] 本发明还提供了组合物,其包含根据本发明的细胞,例如工程化免疫效应细胞。适当地,组合物可以包含根据本发明的细胞群。适当地,组合物可以包含根据本发明的双特异性蛋白。

[0514] 适当地,本发明提供包含工程化细胞的组合物,所述工程化细胞包含根据本发明的CAR。适当地,组合物可以包含工程化细胞群,所述工程化细胞包含根据本发明的CAR。适当地,本发明提供了组合物,其包含表达根据本发明的双特异性蛋白的工程化细胞。适当地,组合物可以包含表达根据本发明的双特异性蛋白的工程化细胞群。

[0515] 在一些实施方案中,组合物是药物组合物。此类药物组合物可以包含药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂或佐剂。药物载剂、赋形剂或稀释剂的选择可以根据预期的施用途径和标准药物实践来选择。药物组合物可以包含(或添加)载剂、赋形剂或稀释剂、任何合适的结合剂、润滑剂、助悬剂、包衣剂、增溶剂和其他载剂药物。

[0516] 药物组合物通常应该是无菌的并且在制备和储存条件下是稳定的。用于肠胃外施用的配制剂包括但不限于混悬液、溶液、在油性或水性媒介物中的乳剂、糊剂和如本文所讨论的可植入缓释或生物可降解配制剂。可使用无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂制备无菌可注射配制剂。根据本发明使用的药物组合物可以包括在使用的剂量和浓度下对受试者无毒的药学上可接受的分散剂、润湿剂、助悬剂、等渗剂、包衣、抗细菌和抗真菌剂、载剂、赋形剂、盐或稳定剂。优选地,此类组合物可以进一步包含用于治疗疾病的药学上可接受的载剂或赋形剂,其与给定的施用方法和/或施用部位,例如肠胃外施用(例如皮下、皮内或静脉内注射)或鞘内施用相容。

[0517] 其中药物组合物包含根据本发明的细胞,该组合物可以使用现行良好生产规范(cGMP)来生产。

[0518] 适当地,包含根据本发明的细胞的药物组合物可以包含有机溶剂,例如但不限于乙酸甲酯、二甲基亚砷(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲氧基乙烷(DME)和二甲基乙酰胺,包括它们的混合物或组合。

[0519] 适当地,包含根据本发明的细胞的药物组合物不含内毒素。

[0520] 治疗方法/用途

[0521] 本发明提供了用于治疗和/或预防疾病的方法,其包括将本发明的细胞或通过根据本发明的方法可获得(例如获得)的细胞施用于受试者的步骤。

[0522] 本发明提供了用于治疗和/或预防疾病的方法,其包括将本发明的药物组合物或通过根据本发明的方法可获得(例如获得)的药物组合物施用于受试者的步骤。

[0523] 本发明还提供本发明的细胞或通过根据本发明的方法可获得(例如获得)的细胞用于治疗 and/或预防疾病。

[0524] 本发明还提供本发明的药物组合物用于治疗 and/或预防疾病。

[0525] 本发明还涉及根据本发明的细胞在制备用于治疗 and/或预防疾病的药物中的用

途。

[0526] 优选地,本治疗方法涉及对受试者施用本发明的药物组合物。

[0527] 术语“治疗/处理/疗法”是指将细胞或药物组合物施用于患有现有疾病或病症的受试者以减轻、减少或改善与该疾病相关的至少一种症状和/或减缓、减少或阻止疾病的进展。

[0528] 如本文所用,提及“预防”/“防止”(或防治)是指延迟或预防疾病症状的发作。预防可能是绝对的(这样就不会发生疾病),也可能只对某些人有效或只在有限的时间内有效。

[0529] 在本发明的优选实施方案中,本文所述的任何方法的受试者是哺乳动物,优选猫、狗、马、驴、绵羊、猪、山羊、牛、小鼠、大鼠、兔或豚鼠。优选地,受试者是人。

[0530] 本发明的药物组合物的施用可以使用使活性成分生物可利用的多种途径中的任一种来完成。例如,根据本发明的细胞或药物组合物可以静脉内、鞘内、通过口服和肠胃外途径、鼻内、腹膜内、皮下、经皮或肌肉内施用。

[0531] 适当地,根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物可以静脉内施用。

[0532] 适当地,根据本发明的细胞或根据本发明的药物组合物鞘内施用。

[0533] 通常,医生会确定最适合个体受试者的实际剂量,并且其会随着特定患者的年龄、体重和反应而变化。剂量足以减轻和/或预防疾病症状。

[0534] 本领域技术人员将理解,例如,递送途径(例如,口服、静脉内、皮下等)可能影响剂量和/或所需剂量可能影响递送途径。例如,当对特定部位或位置内特别高浓度的药剂感兴趣时,集中递送可以是期望的和/或有用的。在针对给定治疗方案优化途径和/或给药方案时要考虑的其他因素可以包括,例如,正在治疗的疾病(例如,类型或阶段等)、受试者的临床状况(例如,年龄、整体健康状况等)、是否存在联合疗法、以及医生已知的其他因素。

[0535] 剂量足以稳定或改善疾病的症状。

[0536] 本发明还提供了治疗和/或预防疾病的方法,该方法包括施用包含工程化细胞例如已被工程化以向受试者表达根据本发明的CAR的细胞的药物组合物的步骤。

[0537] 适当地,本发明还提供了用于治疗和/或预防疾病的方法,其包括将根据本发明的细胞或通过根据本发明的方法可获得(例如获得)的细胞施用于受试者的步骤。

[0538] 在一方面,该方法可以包括以下步骤:

[0539] (i) 从受试者中分离含有细胞的样品;

[0540] (ii) 将a) 编码包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域的CAR的多核苷酸;b) 编码双特异性蛋白的多核苷酸,双特异性蛋白包含结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和结合细胞表面抗原的第二结合结构域;引入所述来自(i)的所述分离的细胞,以及

[0541] (iii) 将来自(ii)的细胞施用于受试者。

[0542] 在另一方面,该方法可以包括:

[0543] 向受试者施用双特异性蛋白,其包含:结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和结合细胞表面抗原的第二结合结构域,

[0544] 其中所述受试者包含工程化细胞,所述工程化细胞包含编码CAR的核酸序列,所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域。

[0545] 在另一方面,该方法可以包括以下步骤:

- [0546] (i)从受试者中分离含有细胞的样品；
- [0547] (ii)将编码包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域的CAR的多核苷酸引入来自(i)的所述分离的细胞；
- [0548] (iii)将来自(ii)的细胞施用于受试者；和
- [0549] (iv)施用编码双特异性蛋白质的多核苷酸，所述双特异性蛋白质包含：结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域；和结合细胞表面抗原的第二结合结构域；至包含工程化CAR细胞的受试者。
- [0550] 适当地，来自(ii)的细胞可以在施用于受试者之前在体外扩增。
- [0551] 疾病
- [0552] 疾病可以是例如癌症。
- [0553] 适当地，通过本发明的方法和用途治疗和/或预防的疾病可以是癌症。
- [0554] 适当地，通过本发明的方法和用途治疗和/或预防的疾病可以是血液恶性肿瘤。
- [0555] 如本文所用，“血液恶性肿瘤”是指影响血液和淋巴系统的癌症，包括白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和相关的血液病症。
- [0556] 适当地，通过本发明的方法和用途治疗和/或预防的疾病可以是恶性实体瘤。实体瘤包括肉瘤、癌和淋巴瘤。
- [0557] 待治疗和/或预防的疾病可以选自上表1-4中列出的那些。
- [0558] 待治疗和/或预防的疾病可以与磷酸抗原有关。
- [0559] 例如，磷酸抗原可以选自：KRAS(例如其中磷残基是S181)、BRAF(例如其中磷残基是T599和/或S602)、Aurora A(例如其中磷残基是T288和/或T287)和ERG(例如其中磷残基是S96和/或S215)。
- [0560] 待治疗和/或预防的疾病可以与融合蛋白有关。
- [0561] 例如，融合蛋白可以选自：AML4-ALK、CCD6-RET和NCOA4-RET。
- [0562] 待治疗和/或预防的疾病可以与点突变有关。
- [0563] 例如，点突变可以在TP53(例如，其中点突变选自：R175H、G245S、R248Q、R248W、R249S、R273H、R273C、R282W和/或Y220C)、KRAS(其中点突变选自：G12C、G12R、G12S、G12A、G12D、G12V、G13D、G13C、G13V、Q61H、Q61R和/或A146T)或BRAF(其中点突变选自：V600E、G469A、G469V、K601E、D594N、D594G和/或N581S)。
- [0564] 待治疗和/或预防的疾病可以与选自以下的肿瘤抗原相关：PRAME、存活素、WT1和端粒酶。
- [0565] 方法
- [0566] 本发明还提供了用于产生细胞的方法，该方法包括在体外或离体将编码如本文所定义的CAR的多核苷酸引入细胞中。
- [0567] 本发明还提供了用于产生细胞的方法，该方法包括在体外或离体将编码如本文所定义的双特异性蛋白的多核苷酸引入细胞中。适当地，可以将编码CAR和双特异性蛋白的多核苷酸引入相同细胞中。一个多核苷酸可以编码CAR和双特异性蛋白。
- [0568] 适当地，该方法可以包括在体外或离体将编码如本文所定义的CAR的核酸构建体引入细胞。适当地，该方法可以包括在体外或离体将编码如本文所定义的双特异性蛋白的核酸构建体引入细胞。适当地，可以将编码CAR和双特异性蛋白的核酸构建体引入相同细

胞。一个核酸构建体可以编码CAR和双特异性蛋白。

[0569] 适当地,该方法可以包括在体外或离体向细胞中引入包含编码如本文所定义的CAR的多核苷酸的载体。适当地,该方法可以包括在体外或离体向细胞中引入包含编码如本文所定义的双特异性蛋白的多核苷酸的载体。适当地,可以将用于编码CAR和双特异性蛋白的载体引入相同细胞。一个载体可以编码CAR和双特异性蛋白。

[0570] 适当地,该方法可以进一步包括在允许表达本发明的CAR分子和/或双特异性蛋白的条件下孵育细胞。任选地,该方法可以进一步包括纯化工程化细胞的步骤。

[0571] 适当地,细胞可以是免疫效应细胞。

[0572] 适当地,细胞可以是溶细胞性细胞。

[0573] 适当地,细胞可以是T细胞。

[0574] 适当地,细胞可以是NK细胞。

[0575] 在一方面,细胞可以是干细胞。

[0576] 适当地,在根据本发明的方法中,可以将编码如本文所定义的CAR和/或双特异性蛋白的核酸引入干细胞中,然后干细胞分化成T细胞。适当地,在根据本发明的方法中,可以将编码如本文所定义的CAR的核酸引入干细胞中,然后干细胞分化成NK细胞。

[0577] 适当地,干细胞可以具有分化成T细胞的能力。

[0578] 适当地,干细胞可以具有分化成NK细胞的能力。

[0579] 适当地,细胞可以是胚胎干细胞(ESC)。适当地,细胞可以从脐带血中获得。适当地,细胞可从成人外周血中获得。适当地,细胞是造血干细胞和祖细胞(HSPC)。适当地,细胞是诱导多能干细胞(iPSC)。

[0580] 在另一方面,细胞是祖细胞。适当地,祖细胞具有分化成T细胞的能力。适当地,祖细胞具有分化成NK细胞的能力。

[0581] 在另一方面,本发明提供了用于产生包含根据本发明的CAR的工程化细胞的方法。在另一个方面,本发明提供了用于产生包含编码根据本发明的双特异性蛋白的多核苷酸的工程化细胞的方法。

[0582] 适当地,该方法可以包括在体外或离体将编码根据本发明的CAR和/或双特异性蛋白的多核苷酸引入细胞中。

[0583] 适当地,CAR和双特异性蛋白可以由相同的多核苷酸提供。

[0584] 适当地,CAR和双特异性蛋白可以作为单独的多核苷酸提供。

[0585] 适当地,可以将单独的多肽分别、依次或同时引入细胞中。当分别或依次引入多肽时,适当地,可以首先引入编码CAR的多核苷酸。当分别或依次引入多肽时,适当地,可以首先引入编码双特异性蛋白的多核苷酸。

[0586] 适当地,该方法可以进一步包括在导致表达本发明的CAR分子和/或双特异性蛋白的条件下孵育细胞。任选地,该方法可以进一步包括纯化工程化细胞的步骤。

[0587] 在一方面,本发明提供了用于产生工程化细胞的方法,该方法包括在体外或离体将编码CAR的多核苷酸引入细胞中并将该细胞分化成T细胞。适当地,该方法可以进一步包括在导致本发明的CAR分子表达的条件下孵育细胞。任选地,该方法可以进一步包括纯化包含根据本发明的CAR的工程化细胞的步骤。

[0588] 适当地,在一方面,在将编码CAR的一个或多个多核苷酸引入细胞之前,细胞可以

分化成T细胞。

[0589] 工程化细胞的纯化可以通过本领域已知的任何方法来实现。适当地,可以使用荧光激活细胞分选(FACS)或免疫磁性分离(即使用附着于磁性纳米颗粒或珠的抗体)使用细胞群的阳性和/或阴性选择来纯化工程化细胞。

[0590] 适当地,可以使用如本文所定义的CAR的表达来进行工程化细胞的纯化。

[0591] 本发明还提供了将蛋白质释放到肿瘤微环境中的裂解肿瘤细胞的方法,该方法包括向细胞中引入

[0592] 1) 编码CAR的多核苷酸,所述CAR包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域;和

[0593] 2) 编码双特异性蛋白的多核苷酸,双特异性蛋白包含结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。

[0594] 用途

[0595] 本发明还提供根据本发明或通过根据本发明的方法可获得(例如获得)的药物组合物或细胞(例如细胞群,例如工程化细胞群)用于治疗疾病。药物组合物或细胞(例如工程化细胞)可以是如上所定义的任一种。

[0596] 本发明还涉及根据本发明的或通过根据本发明的方法可获得(例如获得)的如上所定义的细胞或细胞群在制备用于疾病治疗的药物中的用途。

[0597] 本发明还提供根据本发明或通过根据本发明的方法可获得(例如获得)的双特异性蛋白用于治疗疾病。双特异性蛋白可以是如上所定义的任一种。

[0598] CAR系统

[0599] 本发明提供了CAR系统,其包括:

[0600] (i) 包含结合肿瘤抗原的第一表位的结合结构域、跨膜结构域和信号传导结构域的受体组分;和

[0601] ii) 双特异性蛋白质,其包含:

[0602] 结合所述肿瘤抗原的第二表位的第一结合结构域;和

[0603] 结合细胞表面组织抗原的表位的第二结合结构域。

[0604] 该系统可以包括包含或表达受体组分的免疫效应细胞。例如,该系统可以包括包含或表达受体组分的 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞或的巨噬细胞。

[0605] 该系统可以包括表达双特异性蛋白的免疫效应细胞。例如,该系统可以包括表达双特异性蛋白的 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞或的巨噬细胞。

[0606] 适当地,受体组分和双特异性蛋白可以由相同细胞例如免疫效应细胞表达。

[0607] 在一些方面,该系统包括肿瘤微环境。适当地,可以将双特异性蛋白施用至所述系统。换言之,将双特异性蛋白引入肿瘤微环境。例如,双特异性蛋白不在肿瘤微环境中产生,而是通过瘤内注射引入肿瘤微环境。

[0608] 本公开不受本文公开的示例性方法和材料的限制,任何与本文描述的方法和材料相似或等同的方法和材料都可以用于实施或测试本公开的实施方案。数值范围包括定义范围的数字。除非另有说明,否则任何核酸序列均以5' 到3' 方向从左到右书写;氨基酸序列分别以氨基到羧基的方向从左到右书写。

[0609] 在提供值范围的情况下,应当理解,除非上下文另有明确规定,还具体公开了该范

围的上限和下限之间的每个中间值,直至下限单位的十分之一。任何规定值或规定范围内的中间值与任何其他规定值或该规定范围内的中间值之间的每个较小范围均涵盖在本公开中。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在范围内或排除在范围内,并且在较小范围内包括其中一个限制、不包括限制或包括两个限制中的每个范围也涵盖在本公开中,适用于规定范围内任何具体排除的限制。在所述范围包括一个或两个限制的情况下,不包括其中一个或两个限制的范围也包括在本公开中。

[0610] 必须注意,如本文和所附权利要求中所用,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代物,除非上下文另有明确规定。

[0611] 如本文所用,术语“包含”、“包括”和“含有”与“包含”、“包括”或“包含”、“含有”同义,并且是包容性的或开放式的,不排除额外的、非列举的成员、元素或方法步骤。术语“包含”、“包括”和“含有”还包括术语“由……组成”。

[0612] 要注意的是,可以组合如本文所述的本发明的实施方案。

[0613] 本文讨论的出版物仅供其在本申请的申请日之前公开。本文中的任何内容均不得解释为承认此类出版物构成所附权利要求的现有技术。

[0614] 现将通过实施例进一步描述本发明,实施例旨在帮助本领域普通技术人员实施本发明,而非旨在以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0615] 实施例1-EXOAMP体外靶向CD33阳性和细胞内eGFP表达细胞。

[0616] 作为概念验证,发明人方便地使用eGFP作为肿瘤抗原。CD19或CD33用作组织特异性抗原。生成了识别CD19/eGFP或CD33/eGFP的双特异性蛋白质。生成了独立识别eGFP的CAR。

[0617] 在该实施例中,结果显示EXOAMP GFP靶向CAR裂解双阳性CD33/eGFP表达靶标并保留单阳性CD33表达靶标。

[0618] HL-60细胞系是人白血病细胞系,衍生自急性早幼粒细胞白血病(PML)患者的外周血,为CD19阴性和BCR-ABL阴性。

[0619] 产生了包含以下的效应T细胞:

[0620] 抗CD33 CAR(α CD33g1x-HNG);

[0621] 抗GFP CAR(α GFP_GBP6-HNG);

[0622] CD19-CAR(α CD19FMC63)-这是阴性对照;或

[0623] 非转导(NT);

[0624] 共表达针对GFP/CD33的双特异性结合剂(α GFP-HNG- α CD33串联scFv)[参见图5a)、b)和c)的左侧]或针对GFP/CD19的不相关双特异性结合剂(α GFP-HNG- α CD19)[参见图5a)、b)和c)的右侧]。

[0625] 效应T细胞以1:1的效应与靶标比例针对以下共培养:

[0626] 表达CD33的HL60细胞—参见图5a);

[0627] 表达细胞内eGFP蛋白的HL60细胞(3xMYC-XTEN_L-eGFP)-参见图5b);和表达细胞内嵌合GFP/BCR-ABL蛋白的HL60细胞(p210.p210_BCR-ABL-3xMYC-XTEN_L-eGFP)—参见图5c)。

[0628] 图5中的数据显示,EXOAMP GFP靶向CAR裂解双阳性CD33/eGFP表达靶标并保留单阳性CD33表达靶标,如图5a)、b)和c)中通过三角形的比较所示。

[0629] 该实施例中使用的示例性序列是:p210_BCR-ABL-3xMYC-XTEN_L-eGFP (SEQ ID NO:13)

[0630] MVDPVGF AEAWKAQFPDSEPPRMELRSVGDIEQELERCKASIRRLEQEVNQERFRMIYLQTLLAKEKKS
YDRQRWGFRRAAQAPDGASEPRASASRPQPAPADGADPPPAEEPEARPDGEGSPGKARPGTARRPGAAASGERDDRG
PPASVAALRSNFERIRKGGHQPADA EKPFYVNVFHHHERGLVKVNDKEVSDRISLGSQAMQMERKKSQHGAGSSV
GDASRPPYRGRSSESSCGVDGDYEDAE LNPRFLKDNLIDANGGSRPPWP PLEYQPYQSIYVGGMMEGEGKG PLLRSQ
STSEQEKRLTWPRRSYSPRSFEDCGGGYTPDCSSNENLTSSEEDFSSGQSSRVSPSPPTTYRMFRDKSRSPSQNSQQS
FDSSSPPTPQCHKRHRHCPVVVSEATIVGVRKTGQIWPNDGEGAFHGDADGSFGTPPGYGCAADRAEEQRRHQDGLP
YIDDSPSSSPHLSKGRGSRDALVSGALESTKASELDLEKGLEMRKWVLSGILASEETYLSHLEALLPMKPLKAAA
TTSQPVLTSSQIETIFFKVPELYEIHKEFYDGLFPRVQQWSHQQRVGD L FQKLASQLGVYRAFVDNYGVAMEMA EKC
CQANAQFAEISENLRARSNKDAKDPTTKNSLETLLYKPVDRVTRSTLVLDLLKHTPASHPDHPLLQDALRISQNFL
SSINEEITPRRQSM TVKKGEHRQLLKDSFMVELVEGARKLRHVLF TDL LCTKLKKQSGGKTQQYDCKWYIPLTDL
SFQMVDELEAVPNIPLVPDEELDALKIKISQIKSDIQREKRANKGSKATERLKKKLEQESLLLLMSPSMAFRVHSR
NGKSYTFLISSDYERA EWRENIREQQKKCFRSFSLTSVELQMLTNSCVKLQTVHSIPLTINKEDDESPGLYGFLNVI
VHSATGFKQSSKALQRPVASDFEPQGLSEARWNSKENLLAGPSENDPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLG
YNHNGEWCEAQTKNGQGWPSNYITPVNSLEKHSWYHGVPVSRNAEYLLSSGINGSFLVRESESSPGQRSISLRYEG
RVYHYRINTASDGKLYVSSSRFNTLAELVHHHSTVADGLITTLHYPAPKRKNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDITMKH
KLGGGQYGEVYEGVWKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNL
LDYLRECNRQEVNAVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAK
FPIKWTAPESLAYNKFSIKSDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEGCPEKVYELMRACWQ
WNPSDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKELGKQGVRGAVSTLLQAPELPTKTRTSRRAAEHRD TTDVPEMPHSK
GQGESDPLDHEPAVSPLLPRKERGPPEGGLNEDERLLPKDKKTNLFSALIKKKKKTAPTPPKRSSSFREMDGQPERR
GAGEEEGRDISNGALAF TPLDTADPAKSPKPSNGAGVPNGALRESGGSGFRSPHLWKKSSTLTSSRLATGEEEGGS
SSKRFLRSCSASCVPHGAKDTEWRSVTLPRDLQSTGRQFDSSTFGGHKSEK PALPRKRAGENRSDQVTRGTVTPPPR
LVKKNEEADEVFKDIMESSPGSSPPNLT PKPLRRQVTVAPASGLPHKEEAGKGSALGTPAAAEPVTPTSKAGSGAP
GGTSKGPAEESRVR RHKHSSESPGRDKGKLSRLKPAPPPPPAASAGKAGGKPSQSPSQEAAGEAVLGAKTKATSLVD
AVNSDAAKPSQPGEGLKKPVLPATPKPQSAKPSGTPISPAPVPSTLPSASSALAGDQPSSTAFIPLISTRVSLRKTR
QPPERIASGAITKGVLDSTEALCLAISRNSEQMASHAVLEAGKNLYSFCVSYVDSIQQMRNKFAFREAI NKLENN
LRELQICPATAGSGPAATQDFSKLLSSVKEISDIVQREQKLISEEDLEQKLISEEDLEQKLISEEDLSGSETPGTSE
SATPESMVSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWP TLVTTLTYGVQC
FSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYS
HNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFEV
TAAGITLGMDELYK

[0631] 以上序列中的结构域按顺序为:

[0632] p210_BCR-ABL

[0633] 3xMYC

[0634] XTEN_L接头

[0635] eGFP

[0636] 实施例2-通过 α CD19-CAR和表达靶向GFP/CD19的双特异性蛋白的EXOAMP GFP-CAR和非转导(NT)的T细胞在皮下NOD scid gamma (NSG)小鼠中EXOAMP体内靶向表达CD19的NALM6细胞和细胞内表达GFP的NALM6细胞

[0637] 在该实施例中,结果显示在NSG小鼠两侧肋腹中EXOAMP GFP CAR靶向并裂解表达NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP的双阳性CD19/eGFP肿瘤,同时保留单阳性NALM6肿瘤。

[0638] 图6a)显示了体内NALM6皮下动物模型的时间线、队列、取样和注射途径的详细信息。NALM6是B细胞前体白血病细胞系。其是急性淋巴母细胞白血病的模型;为CD19阳性和CD33阴性。

[0639] 在交替的后肋腹向NSG小鼠注射对照肿瘤(0.5×10^6 NALM6[NALM6.FLuc_x5Red.2A.HA-GPI])和细胞内表达eGFP的肿瘤(NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP[NALM6.FLuc_x5Red.2A.HA-GPI/3xMYC-XTEN_L-eGFP][即将不同的肿瘤细胞注射到每侧肋腹中导致在小鼠的每侧肋腹发展不同的肿瘤,如图6b)所示]。

[0640] 肿瘤细胞已被转导萤火虫萤光素酶/糖基磷脂酰肌醇锚定的HA标签(FLuc_xRed.2A.HA-GPI),用作经由生物发光成像的体外和体内肿瘤生长的标志物。

[0641] 注射肿瘤细胞三天后,肿瘤内注射 5×10^6 CAR T细胞。

[0642] CAR T细胞是 α CD19_FMC63-HNG- α CD19对照CAR;或 α GFP-HNG+GFPxCD19;EXOAMP特异性CAR。

[0643] 来自D3-21的原始图像显示于图6b)中,并显示使用 α CD19-CAR对两种肿瘤的肿瘤控制;和使用EXOAMP GFP CAR的特异性双阳性NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤控制。

[0644] 例如,在图6b)中,左侧的NT PBMC照片组显示从第3天到第21天,两侧肋腹的肿瘤持续发展。图中间的 α CD19-CAR_FMC63-HNG照片组显示了对两种不同肿瘤类型的控制,因为在注射了两种类型肿瘤细胞的肋腹上没有肿瘤或存在小肿瘤。图右侧的EXOAMP (GFP-CAR NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP)照片组显示该CAR仅控制双阳性NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤的生长。可以看出,在用 α GFP-HNG+GFPxCD19 CAR处理时,注射了 0.5×10^6 NALM6肿瘤细胞的肋腹继续生长。

[0645] 该数据在图6c)中以肿瘤部位的平均辐射进一步绘制,这表明仅使用EXOAMP GFP-CAR的特异性肿瘤控制。

[0646] 实线表示NALM6(参见图左侧的图表)和NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP(参见图右侧的图表)的特异性肿瘤平均辐射。线条表示每个受试小鼠/队列的平均读数。

[0647] 该实施例中使用的示例性序列是:

[0648] 细胞内3xMYC-XTEN_L-eGFP(SEQ ID NO:12)

[0649] EQKLISEEDLEQKLISEEDLEQKLISEEDLSGSETPGTSESATPESMVSKGEELFTGVVPILVELDGDV
NGHKFSVSGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF
FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

[0650] 以上序列中的结构域按顺序为:

[0651] 3xMYC

[0652] XTEN_L接头

[0653] eGFP

[0654] 实施例3-通过 α CD19-CAR和表达靶向GFP/CD19的双特异性蛋白或靶向GFP/CD33的无关蛋白的EXOAMP GFP-CAR和非转导 (NT) T细胞在皮下NOD scid gamma (NSG) 小鼠中EXOAMP体内靶向表达CD19的NALM6细胞和细胞内表达GFP的NALM6细胞

[0655] 在该实施例中,结果显示在NSG小鼠两侧胁腹中EXOAMP GFP CAR+GFPxCD19靶向并裂解表达双阳性CD19/eGFP的NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤,同时保留单阳性NALM6肿瘤,而GFP-CAR+GFPxCD33类似于NT T细胞无法控制两种肿瘤。

[0656] 图7a) 显示了体内NALM6皮下动物模型的时间线、队列、取样和注射途径的详细信息。

[0657] 在交替部位-左后胁腹和右肩的肿瘤上向NSG小鼠注射对照肿瘤 (0.5×10^6 NALM6 [NALM6.FLuc_x5Red.2A.HA-GPI]) 和细胞内表达eGFP的肿瘤 (NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP [NALM6.FLuc_x5Red.2A.HA-GPI/3xMYC-XTEN_L-eGFP]) [即,将不同的肿瘤细胞注射到每个部位,导致每个部位发展不同的肿瘤,如图7b) 所示]。

[0658] 肿瘤细胞已被转导以表达萤火虫萤光素酶/糖基磷脂酰肌醇锚定的HA标签 (Fluc_xRed.2A.HA-GPI), 用作经由生物发光成像的体外和体内肿瘤生长的标志物。

[0659] 来自D3-21的原始图像显示于图7b中,显示了 α CD19-CAR对两种肿瘤的控制 (参见图中第二组照片,其显示两个注射部位的肿瘤随时间得到控制); 和EXOAMP GFP CAR中的特异性双阳性NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤控制 (参见图中第四组照片,其显示仅NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP肿瘤得到控制。NALM6.FLuc_x5Red.2A.HA-GPI肿瘤在用 α GFP-HNG+GFPxCD19处理时继续生长)。GFP-CAR_GFPxCD33无法控制两种肿瘤 (参见图中第三组照片,其显示肿瘤在两个注射部位生长。CAR无法靶向肿瘤因为其为CD33阴性)。NT T细胞无法控制两种肿瘤 (参见图中第一组照片,其显示肿瘤在两个注射部位生长)。

[0660] 该数据在图7c) 中以肿瘤部位的平均辐射进一步绘制,展示了仅使用EXOAMP GFP-CAR+GFPxCD19的特异性肿瘤控制。

[0661] 实线表示NALM6 (参见图的左侧) 和NALM6.3xMYC-XTEN_L-eGFP (参见图的右侧) 的特异性肿瘤平均辐射。线条表示每个受试小鼠/队列的平均读数。队列2的第一只小鼠 (α CD19_FMC63-HNG) 由于在D21之前体重减轻而必须被淘汰。

[0662] 上述说明书中提及的所有出版物均通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员来说将是显而易见的。尽管已经结合具体的优选实施方案描述了本发明,但是应当理解所要求保护的本发明不应不适当地限制于此类具体的实施方案。实际上,对分子生物学、细胞免疫学或相关领域的技术人员显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修改旨在包含在所附权利要求的范围内。

[0663] 实施例4-用于从细胞上清液中体外检测细胞外p53的夹心ELISA

[0664] 为了在体外检测细胞上清液中的细胞外p53,从汇合的烧瓶中收获结直肠癌细胞系-RK0、HT-29、LS123、LS174T、SW1463和CL-40-并在培养基中洗涤两次并在平底96孔中以 1×10^5 个细胞/孔在200 μ l/孔中铺板。将板在37 $^{\circ}$ C/5% CO₂下保持48小时,之后收获100 μ l上清液并冷冻在-20 $^{\circ}$ C直至使用。

[0665] 对于ELISA,将2 μ g/ml泛p53抗体D0-1克隆在Nunc MaxiSorpTM平底中的0.2M碳酸

钠/碳酸氢钠缓冲液pH 9.6中以100 μ l/孔包被过夜。第二天,洗涤板并用ELISA测定稀释剂(ADA;BioLegend, Inc)轻柔振荡封闭1小时。然后洗涤板并与100 μ l细胞上清液一起孵育2小时,同时轻柔振荡。洗涤板并在孔上以1:2000稀释度以100 μ l/孔在ADA中孵育多克隆兔抗p53抗体(Life Technologies)1小时,同时轻柔振荡。洗涤板并以1:2000稀释度在ADA中孵育二抗辣根过氧化物酶缀合的驴抗兔IgG (Biolegend, Inc) 30分钟,同时轻柔振荡。将板在PBS 0.05% Tween-20中以30秒浸泡洗涤五次。将板与100 μ l/孔TMB底物(BioLegend, Inc)在黑暗中孵育,并使用1M硫酸溶液终止。在450nm和570nm处测量吸光度。

[0666] 对照细胞PBMC使用0.5 μ g/ml CD3/CD28抗体和100IU/ml IL-2激活,或不激活,并以 1×10^5 个细胞/孔的200 μ l/孔接种在平底96孔板中。

[0667] 纯化的p53蛋白用作标准品,从8000pg/ml开始按1:2依次稀释。

[0668] 图8显示在所测试的6种结肠癌细胞系中的5种的上清液中可以检测到胞外p53蛋白。

[0669] 实施例5-表达细胞表面EpCAM和p53突变体R175H的结直肠癌细胞的EXOAMP特异性靶向

[0670] 在与靶标结直肠癌细胞HT-29 (其表达细胞表面EpCAM和p53中的R273H突变) 或S123 (其表达细胞表面EpCAM和p53中的R175H突变) 培养后,测量来自CAR T细胞或未转导的细胞的IL-2和IFN γ 细胞因子释放。

[0671] 每个抗体克隆的可变结构域的序列获自公开可用的序列,并作为人密码子优化的gblock(Integrated DNA Technologies, Inc)订购为单链可变片段(scFv),其含有在VL/VH或VL/VH方向由柔性接头(Gly₄Ser)₄或(Gly₄Ser)₃分隔的Ig kappa链信号肽。根据制造商的方案,使用**Phusion**®高保真DNA聚合酶(New England Biolabs)对gblock进行PCR扩增,并亚克隆到修饰的SFG逆转录病毒载体(含有支架附着区)中,载体与人IgG1铰链、CD28跨膜和细胞内41BB和CD3Z结构域同框并在由明脉扁刺蛾(Thoesa asigna) 2A肽序列分隔的自杀筛选基因RQR8的下游。

[0672] 抗EpCAM结合剂MT110和各种抗p53/抗CD19结合剂的可变结构域序列获自公开可用的序列,并作为具有N端IL-2信号肽和居间的柔性15aa接头(Gly₄Ser)₃的人密码子优化gblock(Integrated DNA Technologies, Inc)订购。使用修饰的引物添加C端丝氨酸-甘氨酸接头Gly₄Ser和六组氨酸标签,并扩增为PCR片段,并亚克隆到CAR下游由马2A肽分隔的修饰的SFG载体中。

[0673] 为了测量来自CAR效应物和靶标细胞的靶标特异性IL-2和IFN γ 释放,将结直肠癌靶标细胞以每200 μ l 1×10^5 个细胞的浓度铺板到96孔平底板中18-24小时,或直至附着。随后,去除100 μ l培养基,将100 μ l中的 5×10^4 CAR T细胞或对照细胞添加到每个孔中,孵育2天用于IL-2测量或孵育7天用于IFN γ 测量。去除100 μ l培养基并使用IL-2或IFN γ 特异性ELISA测定细胞因子浓度。

[0674] 结果:

[0675] 图9显示来自分泌针对EpCAM和突变体p53 R175H的双特异性结合剂(+BSB_MT110/7B9)的泛嗜性p53 CAR(aP53_421)表达T细胞针对LS123细胞(其表达细胞表面EpCAM并含有p53中的R175H突变)的IL-2细胞因子释放。

[0676] 包含抗CD19_FMC63 CAR或抗p53 CAR组合靶向EpCAM/CD19的双特异性结合剂的T

细胞(aP53_421+BSB_Mt110/FMC63)用作阴性对照。这些细胞产生低水平或背景水平的IL-2,与针对HT-29和LS123靶标的非转导细胞相当。

[0677] 包含抗EpCAM靶向CAR的T细胞(抗EpCAM_Mt110)用作阳性对照。这些细胞针对结直肠靶标细胞HT-29和LS123分别分泌4428pg/ml和4249pg/ml IL-2。

[0678] 包含靶向p53的ExoAmp CAR并分泌针对EpCAM和突变体p53 R175H的双特异性结合剂的T细胞(aP53_421+BSB_Mt110/7B9)针对R175H突变体p53细胞系LS123分泌约189pg/ml的IL-2。图9显示这些T细胞针对不表达p53突变体R175H的细胞系HT-29分泌非常低水平或背景水平的IL-2。

[0679] 对于所有测试的CAR,在没有靶标(单独的效应物)的情况下,无法检测到IL-2的水平。

[0680] 图10显示了来自分泌针对EpCAM和突变体p53 R175H的双特异性结合剂(+BSB_Mt110/7B9)的泛嗜性p53 CAR(aP53_421)表达T细胞针对LS123细胞(其表达细胞表面EpCAM,并含有p53中的R175H突变)的IFN γ 细胞因子释放。

[0681] 包含抗CD19_FMC63 CAR或抗p53 CAR组合靶向EpCAM/CD19的双特异性结合剂的T细胞(aP53_421+BSB_Mt110/FMC63)用作阴性对照。这些细胞产生低水平或背景水平的IFN γ ,与针对HT-29和LS123靶标的非转导细胞相当。

[0682] 包含抗EpCAM靶向CAR的T细胞(抗EpCAM_Mt110)用作阳性对照。这些细胞针对结直肠靶标细胞HT-29和LS123分别分泌23735pg/ml和22553pg/ml IFN γ 。

[0683] 包含靶向p53的ExoAmp CAR并分泌针对EpCAM和突变体p53 R175H的双特异性结合剂的T细胞(aP53_421+BSB_Mt110/7B9)针对R175H突变体p53细胞系LS123分泌约7625pg/ml的IFN γ 。图10显示这些T细胞针对不表达p53突变体R175H的细胞系HT-29分泌非常低水平或背景水平的IFN γ 。

[0684] 对于所有测试的CAR,在没有靶标(单独的效应物)的情况下,IFN- γ 的水平无法检测到或处于非常低/背景水平。

[0685] 该实施例中使用的示例性序列是:

[0686] 具有抗EpCAM Mt110 scFv_LH方向的抗EpCAM_Mt110-抗EpCAM CAR共表达RQR8标志物基因、IgG1铰链间隔物、CD28TM结构域以及41BB和CD3Z细胞内结构域(SEQ ID NO:14)。

[0687] 具有抗CD19 FMC63 scFv_LH方向的抗CD19_FMC63-抗CD19 CAR共表达RQR8标志物基因、IgG1铰链间隔物、CD28TM结构域以及41BB和CD3Z细胞内结构域(SEQ ID NO:2)。

[0688] 具有抗p53 pAb421 scFv_LH方向的aP53_421+BSB_Mt110/7B9-抗p53CAR共表达RQR8标志物基因、IgG1铰链间隔物、CD28TM结构域以及41BB和CD3Z细胞内结构域;和带六组氨酸标签的靶向EpCAM(Mt110_LH)和mutp53 R175H(7B9_HL)的双特异性结合剂(SEQ ID NO:15)。

[0689] 具有抗p53 pAb421 scFv_LH方向的aP53_421+BSB_Mt110/FMC63-抗p53 CAR共表达RQR8标志物基因、IgG1铰链间隔物、CD28TM结构域以及41BB和CD3Z细胞内结构域;和带六组氨酸标签的靶向EpCAM(Mt110_LH)和CD19(FMC63_HL)的双特异性结合剂(SEQ ID NO:16)。

[0690] 实施例6-EXOAMP体外细胞毒性测定

[0691] 进行了体外实时细胞毒性杀伤测定。mKate2阳性结直肠癌靶标细胞-LS123-以

2×10^4 个细胞/200 μ l 的浓度使用 50:50 培养基/条件培养基 (来自生长的 LS123 细胞) 铺板在 96 孔平底板中 18-24 小时, 或直至附着。随后, 去除 50 μ l 培养基, 将 50 μ l 中的 8×10^4 个 CAR T 细胞或对照细胞以 4:1E:T (CAR:靶标) 的比例添加到每个孔中, 孵育 120 小时并在 IncuCyte S3 活细胞分析系统 (Essen Biotech) 上进行检测。以 10 倍放大每孔每小时拍摄两张图像。使用 IncuCyte®Zoom 软件分析数据以检测和计数每张图像中 mKate2 阳性细胞核的数量。

[0692] 结果

[0693] 图 11 显示了分泌针对 EpCAM 和突变体 p53 R175H 的双特异性结合剂 (+BSB_MT110/7B9) 的泛嗜性 p53 CAR (aP53_421) 表达 T 细胞针对表达细胞表面 EpCAM 并含有突变体 p53 R175H 的 LS123 细胞的体外实时细胞毒性。对照效应物包括非转导细胞 (NT) 和阳性对照 CAR 抗 EpCAM (aEpCAM_MT110)。

[0694] 图 11 显示 ExoAmp 特异性 CAR aP53_421+BSB_MT110-7B9 能够特异性裂解靶标 LS123 细胞。与具有 27.63 小时的 KT50 的阳性对照 aEpCAM_MT110 相比, ExoAmp 特异性 CAR aP53_421+BSB_MT110-7B9 杀伤 50% 的靶标细胞所需的时间的量 (KT50) 为 60.18 小时。

序列表

<110> UCL商务有限公司

<120> 嵌合抗原受体细胞

<130> P119492PCT

<150> GB 2008688.0

<151> 2020-06-09

<160> 18

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 528

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RQR8-2A-aGFP_GBP6-HNG-CD28TM-41BBZ示例性序列

<400> 1

```

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

```

180	185	190
Pro Gly Ser Thr Gly Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser		
195	200	205
Val Gln Thr Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Pro Tyr		
210	215	220
Ile Gly Ser Arg Ile Ser Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
225	230	235
Val Arg Glu Gly Val Ala Leu Ile Asn Ser Arg Asp Gly Ser Thr Tyr		
245	250	255
Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Gly Asp Ala		
260	265	270
Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala		
275	280	285
Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Trp Gly Gln Ile Thr Asp Ile Gln Ala		
290	295	300
Leu Ala Val Ala Ser Phe Pro Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr		
305	310	315
Val Ser Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr		
325	330	335
Cys Pro Pro Cys Pro Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val		
340	345	350
Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile		
355	360	365
Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		
370	375	380
Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp		
385	390	395
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
405	410	415
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
420	425	430
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
435	440	445
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
450	455	460
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
465	470	475
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
485	490	495

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 500 505 510
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 515 520 525
 <210> 2
 <211> 651
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> RQR8-2A-aCD19FMC63_LH-HNG-CD28TM-41BBZ示例性序列
 <400> 2
 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
 35 40 45
 Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
 50 55 60
 Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
 65 70 75 80
 Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
 85 90 95
 Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
 100 105 110
 Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 115 120 125
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
 130 135 140
 Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu
 145 150 155 160
 Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 165 170 175
 Pro Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val
 180 185 190
 Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 210 215 220

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr			
225	230	235	240
Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro			
	245	250	255
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile			
	260	265	270
Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly			
	275	280	285
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr			
	290	295	300
Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
305	310	315	320
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly			
	325	330	335
Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly			
	340	345	350
Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg			
	355	360	365
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr			
	370	375	380
Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser			
385	390	395	400
Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr			
	405	410	415
Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala			
	420	425	430
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro			
	435	440	445
Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	450	455	460
Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala			
465	470	475	480
Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg			
	485	490	495
Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe			
	500	505	510
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg			
	515	520	525
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser			

530	535	540
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
545	550	555
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		560
565	570	575
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
580	585	590
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
595	600	605
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
610	615	620
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
625	630	635
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		640
645	650	
<210> 3		
<211> 654		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> RQR8-2A-aCD33glx_LH-HNG-CD28TM-41BBZ示例性序列		
<400> 3		
Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala		
1	5	10
Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly		
20	25	30
Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser		
35	40	45
Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser		
50	55	60
Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro		
65	70	75
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		
85	90	95
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu		
100	105	110
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys		
115	120	125
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg		

130	135	140
Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu		
145	150	155
Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly		
165	170	175
Pro Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu		
180	185	190
Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu		
195	200	205
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu		
210	215	220
Asp Ile Tyr Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala		
225	230	235
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro		
245	250	255
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile		
260	265	270
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr		
275	280	285
Lys Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
290	295	300
Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
305	310	315
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly		
325	330	335
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala		
340	345	350
Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala		
355	360	365
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly		
370	375	380
Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg		
385	390	395
Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala		
405	410	415
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly		
420	425	430
Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
435	440	445

Met Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 450 455 460
 Pro Cys Pro Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 465 470 475 480
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 485 490 495
 Trp Val Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 500 505 510
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 515 520 525
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 530 535 540
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 545 550 555 560
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 565 570 575
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 580 585 590
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 595 600 605
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 610 615 620
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 625 630 635 640
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 645 650

<210> 4

<211> 963

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RQR8-2A-aGFP_GBP6-HNG-CD28TM-41BBZ-E2A-aGFP_kub4_VHH-L3-aCD33glx_
LH-H6示例性序列

<400> 4

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

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

Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile		
355	360	365
Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		
370	375	380
Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp		
385	390	400
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
	405	410
		415
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
	420	425
		430
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
	435	440
		445
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
450	455	460
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
465	470	475
		480
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
	485	490
		495
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
	500	505
		510
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
	515	520
		525
Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser		
530	535	540
Asn Pro Gly Pro Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu		
545	550	555
		560
Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly		
	565	570
		575
Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala		
	580	585
		590
Ser Gly Phe Pro Val Asn Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala		
595	600	605
Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp		
610	615	620
Arg Ser Ser Tyr Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg		
625	630	635
		640
Asp Asp Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro		
	645	650
		655
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr		

660	665	670
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Asp Pro Ser Gly Gly		
675	680	685
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln		
690	695	700
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val		
705	710	715
Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Phe Asn Leu Val Trp		
725	730	735
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr		
740	745	750
Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
755	760	765
Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe		
770	775	780
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly		
785	790	795
Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
805	810	815
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ser		
820	825	830
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
835	840	845
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr		
850	855	860
Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
865	870	875
Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val		
885	890	895
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr		
900	905	910
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
915	920	925
Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
930	935	940
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser His His His		
945	950	955
His His His		960

<210> 5

<211> 957

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RQR8-2A-aGFP_GBP6-HNG-CD28TM-41BBZ-E2A-aGFP_kub4_VHH-L3-aCD19FMC6
3_HL-H6示例性序列

<400> 5

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

Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Gly	Asp	Ala	260	265	270
Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	275	280	285
Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Arg	Trp	Gly	Gln	Ile	Thr	Asp	Ile	Gln	Ala	290	295	300
Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Phe	Pro	Asp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	305	310	315
Val	Ser	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	325	330	335
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	340	345	350
Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	355	360	365
Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	370	375	380
Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	385	390	395
Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	405	410	415
Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	420	425	430
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	435	440	445
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	450	455	460
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	465	470	475
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	485	490	495
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	500	505	510
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	515	520	525
Gln	Cys	Thr	Asn	Tyr	Ala	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Ser	530	535	540
Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Tyr	Arg	Met	Gln	Leu	Leu	Ser	Cys	Ile	Ala	Leu	545	550	555
Ser	Leu	Ala	Leu	Val	Thr	Asn	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly			

				565					570					575			
Gly	Ala	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala		
				580					585					590			
Ser	Gly	Phe	Pro	Val	Asn	Arg	Tyr	Ser	Met	Arg	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala		
				595					600					605			
Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Trp	Val	Ala	Gly	Met	Ser	Ser	Ala	Gly	Asp		
				610					615					620			
Arg	Ser	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg		
625							630							635			640
Asp	Asp	Ala	Arg	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro		
				645					650					655			
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Val	Asn	Val	Gly	Phe	Glu	Tyr		
				660					665					670			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Gly		
				675					680					685			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys		
				690					695					700			
Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser		
705							710							715			720
Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser		
				725					730					735			
Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile		
				740					745					750			
Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu		
				755					760					765			
Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn		
				770					775					780			
Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr		
785							790							795			800
Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser		
				805					810					815			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
				820					825					830			
Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser		
				835					840					845			
Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp		
				850					855					860			
Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val		
865							870							875			880

Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 885 890 895
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 900 905 910
 Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
 915 920 925
 Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys
 930 935 940
 Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His
 945 950 955

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 信号肽

<400> 6

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
 20

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头肽

<400> 7

Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头肽

<400> 8

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

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> XTEN接头肽

<400> 9

Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 415

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> aGFP_kub4_VHH-L3-aCD33glx_LH-H6双特异性蛋白

<400> 10

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

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

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro
 35 40 45

Val Asn Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
 50 55 60

Arg Glu Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ser Tyr
 65 70 75 80

Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Arg
 85 90 95

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Asp Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

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

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 165 170 175

Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys

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

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
1				5					10					15	
Gly	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val

			20				25				30				
Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro
			35				40				45				
Val	Asn	Arg	Tyr	Ser	Met	Arg	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu
			50				55				60				
Arg	Glu	Trp	Val	Ala	Gly	Met	Ser	Ser	Ala	Gly	Asp	Arg	Ser	Ser	Tyr
65			70				75				80				
Glu	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ala	Arg
			85				90				95				
Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala
			100				105				110				
Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Val	Asn	Val	Gly	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			115				120				125				
Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
130			135				140								
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser
145			150				155				160				
Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr
			165				170				175				
Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln
			180				185				190				
Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu
			195				200				205				
Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys
210			215				220								
Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr
225			230				235				240				
Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly
			245				250				255				
Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser
			260				265				270				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
275			280				285								
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
290			295				300								
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr
305			310				315				320				
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
			325				330				335				

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 340 345 350
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 355 360 365
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 370 375 380
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser His His His His His His
 405

<210> 12

<211> 285

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 细胞内3xMYC-XTEN_L-eGFP

<400> 12

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

Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
 180 185 190
 Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
 195 200 205
 Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
 210 215 220
 Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
 225 230 235 240
 Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
 245 250 255
 Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
 260 265 270
 Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 275 280 285

<210> 13

<211> 2316

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p210_BCR-ABL-3xMYC-XTEN_L-eGFP

<400> 13

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

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

450	455	460
His Leu Ser Ser Lys Gly Arg Gly Ser Arg Asp Ala Leu Val Ser Gly		
465	470	475
Ala Leu Glu Ser Thr Lys Ala Ser Glu Leu Asp Leu Glu Lys Gly Leu		
485	490	495
Glu Met Arg Lys Trp Val Leu Ser Gly Ile Leu Ala Ser Glu Glu Thr		
500	505	510
Tyr Leu Ser His Leu Glu Ala Leu Leu Leu Pro Met Lys Pro Leu Lys		
515	520	525
Ala Ala Ala Thr Thr Ser Gln Pro Val Leu Thr Ser Gln Gln Ile Glu		
530	535	540
Thr Ile Phe Phe Lys Val Pro Glu Leu Tyr Glu Ile His Lys Glu Phe		
545	550	555
Tyr Asp Gly Leu Phe Pro Arg Val Gln Gln Trp Ser His Gln Gln Arg		
565	570	575
Val Gly Asp Leu Phe Gln Lys Leu Ala Ser Gln Leu Gly Val Tyr Arg		
580	585	590
Ala Phe Val Asp Asn Tyr Gly Val Ala Met Glu Met Ala Glu Lys Cys		
595	600	605
Cys Gln Ala Asn Ala Gln Phe Ala Glu Ile Ser Glu Asn Leu Arg Ala		
610	615	620
Arg Ser Asn Lys Asp Ala Lys Asp Pro Thr Thr Lys Asn Ser Leu Glu		
625	630	635
Thr Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asp Arg Val Thr Arg Ser Thr Leu Val		
645	650	655
Leu His Asp Leu Leu Lys His Thr Pro Ala Ser His Pro Asp His Pro		
660	665	670
Leu Leu Gln Asp Ala Leu Arg Ile Ser Gln Asn Phe Leu Ser Ser Ile		
675	680	685
Asn Glu Glu Ile Thr Pro Arg Arg Gln Ser Met Thr Val Lys Lys Gly		
690	695	700
Glu His Arg Gln Leu Leu Lys Asp Ser Phe Met Val Glu Leu Val Glu		
705	710	715
Gly Ala Arg Lys Leu Arg His Val Phe Leu Phe Thr Asp Leu Leu Leu		
725	730	735
Cys Thr Lys Leu Lys Lys Gln Ser Gly Gly Lys Thr Gln Gln Tyr Asp		
740	745	750
Cys Lys Trp Tyr Ile Pro Leu Thr Asp Leu Ser Phe Gln Met Val Asp		
755	760	765

Glu Leu Glu Ala Val Pro Asn Ile Pro Leu Val Pro Asp Glu Glu Leu		
770	775	780
Asp Ala Leu Lys Ile Lys Ile Ser Gln Ile Lys Ser Asp Ile Gln Arg		
785	790	795 800
Glu Lys Arg Ala Asn Lys Gly Ser Lys Ala Thr Glu Arg Leu Lys Lys		
	805	810 815
Lys Leu Ser Glu Gln Glu Ser Leu Leu Leu Leu Met Ser Pro Ser Met		
	820	825 830
Ala Phe Arg Val His Ser Arg Asn Gly Lys Ser Tyr Thr Phe Leu Ile		
	835	840 845
Ser Ser Asp Tyr Glu Arg Ala Glu Trp Arg Glu Asn Ile Arg Glu Gln		
	850	855 860
Gln Lys Lys Cys Phe Arg Ser Phe Ser Leu Thr Ser Val Glu Leu Gln		
865	870	875 880
Met Leu Thr Asn Ser Cys Val Lys Leu Gln Thr Val His Ser Ile Pro		
	885	890 895
Leu Thr Ile Asn Lys Glu Asp Asp Glu Ser Pro Gly Leu Tyr Gly Phe		
	900	905 910
Leu Asn Val Ile Val His Ser Ala Thr Gly Phe Lys Gln Ser Ser Lys		
	915	920 925
Ala Leu Gln Arg Pro Val Ala Ser Asp Phe Glu Pro Gln Gly Leu Ser		
	930	935 940
Glu Ala Ala Arg Trp Asn Ser Lys Glu Asn Leu Leu Ala Gly Pro Ser		
945	950	955 960
Glu Asn Asp Pro Asn Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Phe Val Ala Ser		
	965	970 975
Gly Asp Asn Thr Leu Ser Ile Thr Lys Gly Glu Lys Leu Arg Val Leu		
	980	985 990
Gly Tyr Asn His Asn Gly Glu Trp Cys Glu Ala Gln Thr Lys Asn Gly		
	995	1000 1005
Gln Gly Trp Val Pro Ser Asn Tyr Ile Thr Pro Val Asn Ser Leu		
	1010	1015 1020
Glu Lys His Ser Trp Tyr His Gly Pro Val Ser Arg Asn Ala Ala		
	1025	1030 1035
Glu Tyr Leu Leu Ser Ser Gly Ile Asn Gly Ser Phe Leu Val Arg		
	1040	1045 1050
Glu Ser Glu Ser Ser Pro Gly Gln Arg Ser Ile Ser Leu Arg Tyr		
	1055	1060 1065
Glu Gly Arg Val Tyr His Tyr Arg Ile Asn Thr Ala Ser Asp Gly		

1070	1075	1080
Lys Leu Tyr Val Ser Ser	Glu Ser Arg Phe Asn	Thr Leu Ala Glu
1085	1090	1095
Leu Val His His His Ser	Thr Val Ala Asp Gly	Leu Ile Thr Thr
1100	1105	1110
Leu His Tyr Pro Ala Pro	Lys Arg Asn Lys Pro	Thr Val Tyr Gly
1115	1120	1125
Val Ser Pro Asn Tyr Asp	Lys Trp Glu Met Glu	Arg Thr Asp Ile
1130	1135	1140
Thr Met Lys His Lys Leu	Gly Gly Gly Gln Tyr	Gly Glu Val Tyr
1145	1150	1155
Glu Gly Val Trp Lys Lys	Tyr Ser Leu Thr Val	Ala Val Lys Thr
1160	1165	1170
Leu Lys Glu Asp Thr Met	Glu Val Glu Glu Phe	Leu Lys Glu Ala
1175	1180	1185
Ala Val Met Lys Glu Ile	Lys His Pro Asn Leu	Val Gln Leu Leu
1190	1195	1200
Gly Val Cys Thr Arg Glu	Pro Pro Phe Tyr Ile	Ile Thr Glu Phe
1205	1210	1215
Met Thr Tyr Gly Asn Leu	Leu Asp Tyr Leu Arg	Glu Cys Asn Arg
1220	1225	1230
Gln Glu Val Asn Ala Val	Val Leu Leu Tyr Met	Ala Thr Gln Ile
1235	1240	1245
Ser Ser Ala Met Glu Tyr	Leu Glu Lys Lys Asn	Phe Ile His Arg
1250	1255	1260
Asp Leu Ala Ala Arg Asn	Cys Leu Val Gly Glu	Asn His Leu Val
1265	1270	1275
Lys Val Ala Asp Phe Gly	Leu Ser Arg Leu Met	Thr Gly Asp Thr
1280	1285	1290
Tyr Thr Ala His Ala Gly	Ala Lys Phe Pro Ile	Lys Trp Thr Ala
1295	1300	1305
Pro Glu Ser Leu Ala Tyr	Asn Lys Phe Ser Ile	Lys Ser Asp Val
1310	1315	1320
Trp Ala Phe Gly Val Leu	Leu Trp Glu Ile Ala	Thr Tyr Gly Met
1325	1330	1335
Ser Pro Tyr Pro Gly Ile	Asp Leu Ser Gln Val	Tyr Glu Leu Leu
1340	1345	1350
Glu Lys Asp Tyr Arg Met	Glu Arg Pro Glu Gly	Cys Pro Glu Lys
1355	1360	1365

Val Tyr Glu Leu Met Arg Ala Cys Trp Gln Trp Asn Pro Ser Asp		
1370	1375	1380
Arg Pro Ser Phe Ala Glu Ile His Gln Ala Phe Glu Thr Met Phe		
1385	1390	1395
Gln Glu Ser Ser Ile Ser Asp Glu Val Glu Lys Glu Leu Gly Lys		
1400	1405	1410
Gln Gly Val Arg Gly Ala Val Ser Thr Leu Leu Gln Ala Pro Glu		
1415	1420	1425
Leu Pro Thr Lys Thr Arg Thr Ser Arg Arg Ala Ala Glu His Arg		
1430	1435	1440
Asp Thr Thr Asp Val Pro Glu Met Pro His Ser Lys Gly Gln Gly		
1445	1450	1455
Glu Ser Asp Pro Leu Asp His Glu Pro Ala Val Ser Pro Leu Leu		
1460	1465	1470
Pro Arg Lys Glu Arg Gly Pro Pro Glu Gly Gly Leu Asn Glu Asp		
1475	1480	1485
Glu Arg Leu Leu Pro Lys Asp Lys Lys Thr Asn Leu Phe Ser Ala		
1490	1495	1500
Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Thr Ala Pro Thr Pro Pro Lys Arg		
1505	1510	1515
Ser Ser Ser Phe Arg Glu Met Asp Gly Gln Pro Glu Arg Arg Gly		
1520	1525	1530
Ala Gly Glu Glu Glu Gly Arg Asp Ile Ser Asn Gly Ala Leu Ala		
1535	1540	1545
Phe Thr Pro Leu Asp Thr Ala Asp Pro Ala Lys Ser Pro Lys Pro		
1550	1555	1560
Ser Asn Gly Ala Gly Val Pro Asn Gly Ala Leu Arg Glu Ser Gly		
1565	1570	1575
Gly Ser Gly Phe Arg Ser Pro His Leu Trp Lys Lys Ser Ser Thr		
1580	1585	1590
Leu Thr Ser Ser Arg Leu Ala Thr Gly Glu Glu Glu Gly Gly Gly		
1595	1600	1605
Ser Ser Ser Lys Arg Phe Leu Arg Ser Cys Ser Ala Ser Cys Val		
1610	1615	1620
Pro His Gly Ala Lys Asp Thr Glu Trp Arg Ser Val Thr Leu Pro		
1625	1630	1635
Arg Asp Leu Gln Ser Thr Gly Arg Gln Phe Asp Ser Ser Thr Phe		
1640	1645	1650
Gly Gly His Lys Ser Glu Lys Pro Ala Leu Pro Arg Lys Arg Ala		

1655	1660	1665
Gly Glu Asn Arg Ser Asp	Gln Val Thr Arg Gly	Thr Val Thr Pro
1670	1675	1680
Pro Pro Arg Leu Val Lys	Lys Asn Glu Glu Ala	Ala Asp Glu Val
1685	1690	1695
Phe Lys Asp Ile Met Glu	Ser Ser Pro Gly Ser	Ser Pro Pro Asn
1700	1705	1710
Leu Thr Pro Lys Pro Leu	Arg Arg Gln Val Thr	Val Ala Pro Ala
1715	1720	1725
Ser Gly Leu Pro His Lys	Glu Glu Ala Gly Lys	Gly Ser Ala Leu
1730	1735	1740
Gly Thr Pro Ala Ala Ala	Glu Pro Val Thr Pro	Thr Ser Lys Ala
1745	1750	1755
Gly Ser Gly Ala Pro Gly	Gly Thr Ser Lys Gly	Pro Ala Glu Glu
1760	1765	1770
Ser Arg Val Arg Arg His	Lys His Ser Ser Glu	Ser Pro Gly Arg
1775	1780	1785
Asp Lys Gly Lys Leu Ser	Arg Leu Lys Pro Ala	Pro Pro Pro Pro
1790	1795	1800
Pro Ala Ala Ser Ala Gly	Lys Ala Gly Gly Lys	Pro Ser Gln Ser
1805	1810	1815
Pro Ser Gln Glu Ala Ala	Gly Glu Ala Val Leu	Gly Ala Lys Thr
1820	1825	1830
Lys Ala Thr Ser Leu Val	Asp Ala Val Asn Ser	Asp Ala Ala Lys
1835	1840	1845
Pro Ser Gln Pro Gly Glu	Gly Leu Lys Lys Pro	Val Leu Pro Ala
1850	1855	1860
Thr Pro Lys Pro Gln Ser	Ala Lys Pro Ser Gly	Thr Pro Ile Ser
1865	1870	1875
Pro Ala Pro Val Pro Ser	Thr Leu Pro Ser Ala	Ser Ser Ala Leu
1880	1885	1890
Ala Gly Asp Gln Pro Ser	Ser Thr Ala Phe Ile	Pro Leu Ile Ser
1895	1900	1905
Thr Arg Val Ser Leu Arg	Lys Thr Arg Gln Pro	Pro Glu Arg Ile
1910	1915	1920
Ala Ser Gly Ala Ile Thr	Lys Gly Val Val Leu	Asp Ser Thr Glu
1925	1930	1935
Ala Leu Cys Leu Ala Ile	Ser Arg Asn Ser Glu	Gln Met Ala Ser
1940	1945	1950

His Ser Ala Val Leu Glu Ala Gly Lys Asn Leu Tyr Ser Phe Cys		
1955	1960	1965
Val Ser Tyr Val Asp Ser Ile Gln Gln Met Arg Asn Lys Phe Ala		
1970	1975	1980
Phe Arg Glu Ala Ile Asn Lys Leu Glu Asn Asn Leu Arg Glu Leu		
1985	1990	1995
Gln Ile Cys Pro Ala Thr Ala Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Gln		
2000	2005	2010
Asp Phe Ser Lys Leu Leu Ser Ser Val Lys Glu Ile Ser Asp Ile		
2015	2020	2025
Val Gln Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln		
2030	2035	2040
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu		
2045	2050	2055
Glu Asp Leu Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala		
2060	2065	2070
Thr Pro Glu Ser Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly		
2075	2080	2085
Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His		
2090	2095	2100
Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly		
2105	2110	2115
Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val		
2120	2125	2130
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys		
2135	2140	2145
Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys		
2150	2155	2160
Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe		
2165	2170	2175
Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu		
2180	2185	2190
Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe		
2195	2200	2205
Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr		
2210	2215	2220
Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly		
2225	2230	2235
Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser		

2240	2245	2250
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp		
2255	2260	2265
Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser		
2270	2275	2280
Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu		
2285	2290	2295
Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu		
2300	2305	2310
Leu Tyr Lys		
2315		
<210> 14		
<211> 651		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> RQR8-2A-aEpCAM_MT110_LH-HNG-CD28TM-41BBZ示例性序列		
<400> 14		
Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala		
1 5 10 15		
Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly		
20 25 30		
Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser		
35 40 45		
Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser		
50 55 60		
Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro		
65 70 75 80		
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		
85 90 95		
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu		
100 105 110		
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys		
115 120 125		
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg		
130 135 140		
Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu		
145 150 155 160		
Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly		

					165						170					175
Pro	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	
					180						185					190
Pro	Gly	Ser	Thr	Gly	Glu	Leu	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	
					195						200					205
Thr	Val	Thr	Ala	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	
					210						215					220
Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	
225					230					235						240
Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	
					245					250						255
Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	
					260					265						270
Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	
					275					280						285
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	
					290					295						300
Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
305					310					315						320
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	
					325					330						335
Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	
					340					345						350
Tyr	Ala	Phe	Thr	Asn	Tyr	Trp	Leu	Gly	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	
					355					360						365
His	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Phe	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Ile	
					370					375						380
His	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	
385					390					395						400
Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Phe	Glu	Asp	
					405					410						415
Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Leu	Arg	Asn	Trp	Asp	Glu	Pro	Met	
					420					425						430
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Pro	
					435					440						445
Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
					450					455						460
Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	
465					470					475						480

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 485 490 495
 Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 500 505 510
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 515 520 525
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 530 535 540
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 545 550 555 560
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 565 570 575
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 580 585 590
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 595 600 605
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 610 615 620
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 625 630 635 640
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 645 650

<210> 15

<211> 1196

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RQR8-2A-aP53_421_LH-HNG-CD28TM-41BBZ-E2A-aEpCAM_MT110_LH-L-aP53_R
175Hmut_7B9_HL-H6示例性序列

<400> 15

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

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

Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr			
385	390	395	400
Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp			
	405	410	415
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Tyr Gly Asp Ala Leu Asp Tyr Trp			
	420	425	430
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys			
	435	440	445
Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Lys Asp Pro Lys			
	450	455	460
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu			
465	470	475	480
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Gly			
	485	490	495
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val			
	500	505	510
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu			
	515	520	525
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp			
	530	535	540
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn			
545	550	555	560
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg			
	565	570	575
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly			
	580	585	590
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu			
	595	600	605
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
	610	615	620
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His			
625	630	635	640
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys			
	645	650	655
Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Tyr Arg Met Gln			
	660	665	670
Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Glu			
	675	680	685
Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu			

690	695	700
Lys Val Thr Met Ser Cys	Lys Ser Ser Gln Ser	Leu Leu Asn Ser Gly
705	710	715
Asn Gln Lys Asn Tyr Leu	Thr Trp Tyr Gln Gln	Lys Pro Gly Gln Pro
725	730	735
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	Trp Ala Ser Thr Arg	Glu Ser Gly Val Pro
740	745	750
Asp Arg Phe Thr Gly Ser	Gly Ser Gly Thr Asp	Phe Thr Leu Thr Ile
755	760	765
Ser Ser Val Gln Ala Glu	Asp Leu Ala Val Tyr	Tyr Cys Gln Asn Asp
770	775	780
Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr	Phe Gly Ala Gly Thr	Lys Leu Glu Ile Lys
785	790	795
Gly Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Glu
805	810	815
Val Gln Leu Leu Glu Gln	Ser Gly Ala Glu Leu	Val Arg Pro Gly Thr
820	825	830
Ser Val Lys Ile Ser Cys	Lys Ala Ser Gly Tyr	Ala Phe Thr Asn Tyr
835	840	845
Trp Leu Gly Trp Val Lys	Gln Arg Pro Gly His	Gly Leu Glu Trp Ile
850	855	860
Gly Asp Ile Phe Pro Gly	Ser Gly Asn Ile His	Tyr Asn Glu Lys Phe
865	870	875
Lys Gly Lys Ala Thr Leu	Thr Ala Asp Lys Ser	Ser Ser Thr Ala Tyr
885	890	895
Met Gln Leu Ser Ser Leu	Thr Phe Glu Asp Ser	Ala Val Tyr Phe Cys
900	905	910
Ala Arg Leu Arg Asn Trp	Asp Glu Pro Met Asp	Tyr Trp Gly Gln Gly
915	920	925
Thr Thr Val Thr Val Ser	Ser Gly Gly Gly Ser	Glu Val Gln Leu
930	935	940
Gln Gln Ser Gly Pro Glu	Leu Val Lys Pro Gly	Ala Ser Val Lys Ile
945	950	955
Ser Cys Lys Thr Ser Gly	Tyr Thr Phe Thr Glu	Tyr Thr Met His Trp
965	970	975
Met Lys Gln Ser His Gly	Lys Ser Leu Glu Trp	Ile Gly Arg Ile Asn
980	985	990
Pro Tyr Ser Gly Gly Thr	Val Tyr Asn Gln Lys	Phe Lys Gly Lys Ala
995	1000	1005

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu		
1010	1015	1020
Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
1025	1030	1035
Trp Gly Gly Asp Tyr Val Thr Gly Gly Gly Thr Thr Leu Thr Val		
1040	1045	1050
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
1055	1060	1065
Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val		
1070	1075	1080
Ser Gly Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser		
1085	1090	1095
Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln		
1100	1105	1110
Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser		
1115	1120	1125
Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly Ser		
1130	1135	1140
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp		
1145	1150	1155
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr		
1160	1165	1170
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Gly Gly Gly		
1175	1180	1185
Gly Ser His His His His His His		
1190	1195	

<210> 16

<211> 1196

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RQR8-2A-aP53_421_LH-HNG-CD28TM-41BBZ-E2A-aEpCAM_MT110_LH-L-aCD19_
FMC63_HL-H6示例性序列

<400> 16

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

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

Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu		
355	360	365
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr		
370	375	380
Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr		
385	390	395 400
Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp		
	405	410 415
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Tyr Gly Asp Ala Leu Asp Tyr Trp		
	420	425 430
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys		
	435	440 445
Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Lys Asp Pro Lys		
	450	455 460
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu		
465	470	475 480
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Gly		
	485	490 495
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val		
	500	505 510
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu		
	515	520 525
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		
	530	535 540
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		
545	550	555 560
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		
	565	570 575
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		
	580	585 590
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		
	595	600 605
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu		
	610	615 620
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His		
625	630	635 640
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys		
	645	650 655
Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Tyr Arg Met Gln		

660	665	670
Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser	Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Glu	
675	680	685
Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser	Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu	
690	695	700
Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser	Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly	
705	710	715
Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro	
725	730	735
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala	Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro	
740	745	750
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
755	760	765
Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu	Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp	
770	775	780
Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
785	790	795
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu	
805	810	815
Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly	Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr	
820	825	830
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala	Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr	
835	840	845
Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg	Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile	
850	855	860
Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly	Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe	
865	870	875
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala	Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
885	890	895
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe	Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
900	905	910
Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu	Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
915	920	925
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu	
930	935	940
Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val	Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val	
945	950	955
Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser	Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp	
965	970	975

Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp			
980	985	990	
Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr			
995	1000	1005	
Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn			
1010	1015	1020	
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His			
1025	1030	1035	
Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
1040	1045	1050	
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
1055	1060	1065	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr			
1070	1075	1080	
Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys			
1085	1090	1095	
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln			
1100	1105	1110	
Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg			
1115	1120	1125	
Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly			
1130	1135	1140	
Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile			
1145	1150	1155	
Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe			
1160	1165	1170	
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Gly Gly Gly			
1175	1180	1185	
Gly Ser His His His His His His			
1190	1195		
<210> 17			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 柔性接头			
<400> 17			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
1	5	10	15

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 丝氨酸-甘氨酸接头

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

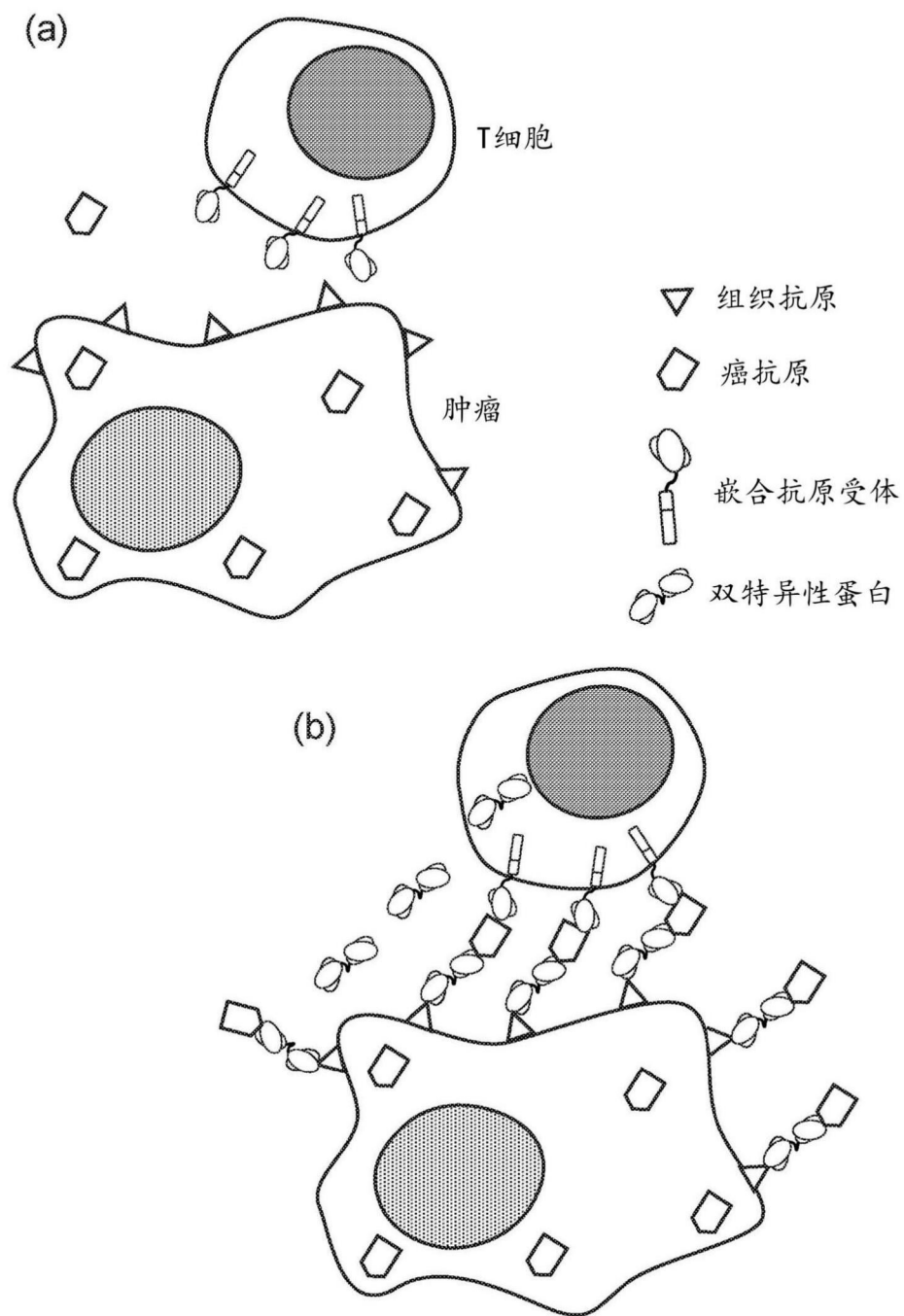


图1

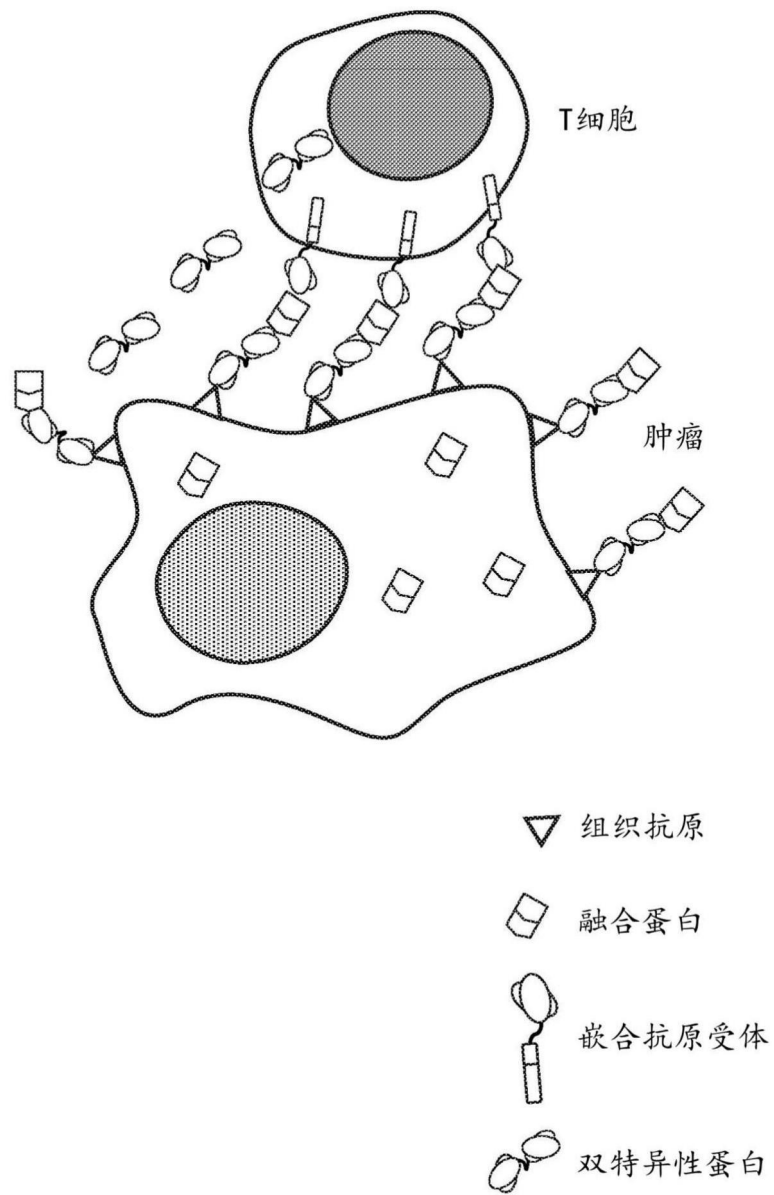


图2

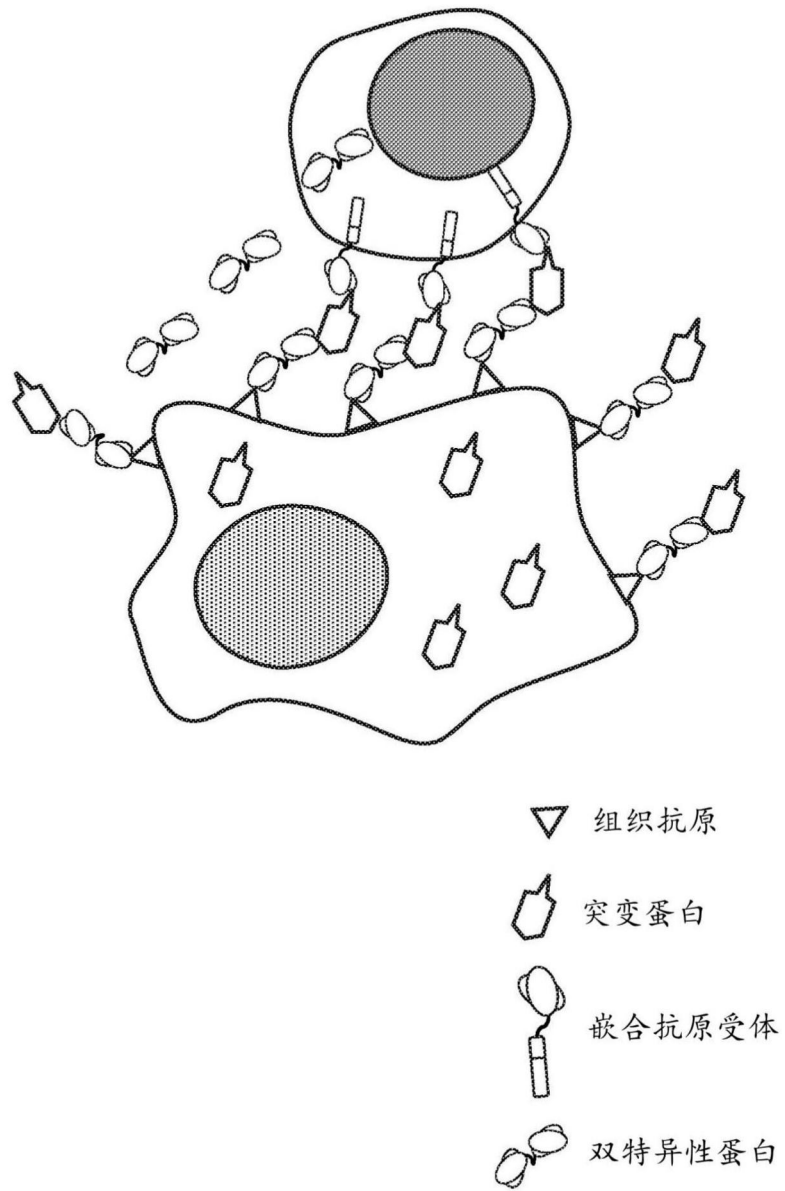


图3

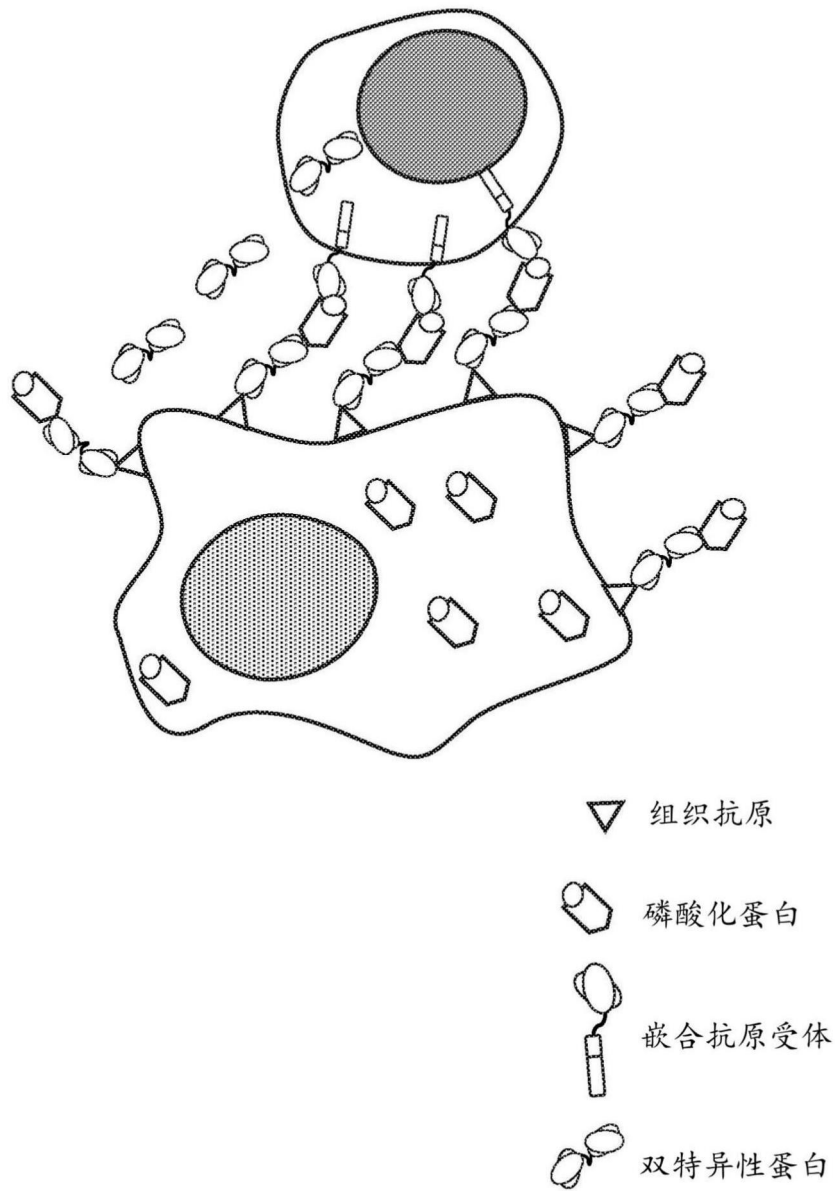


图4

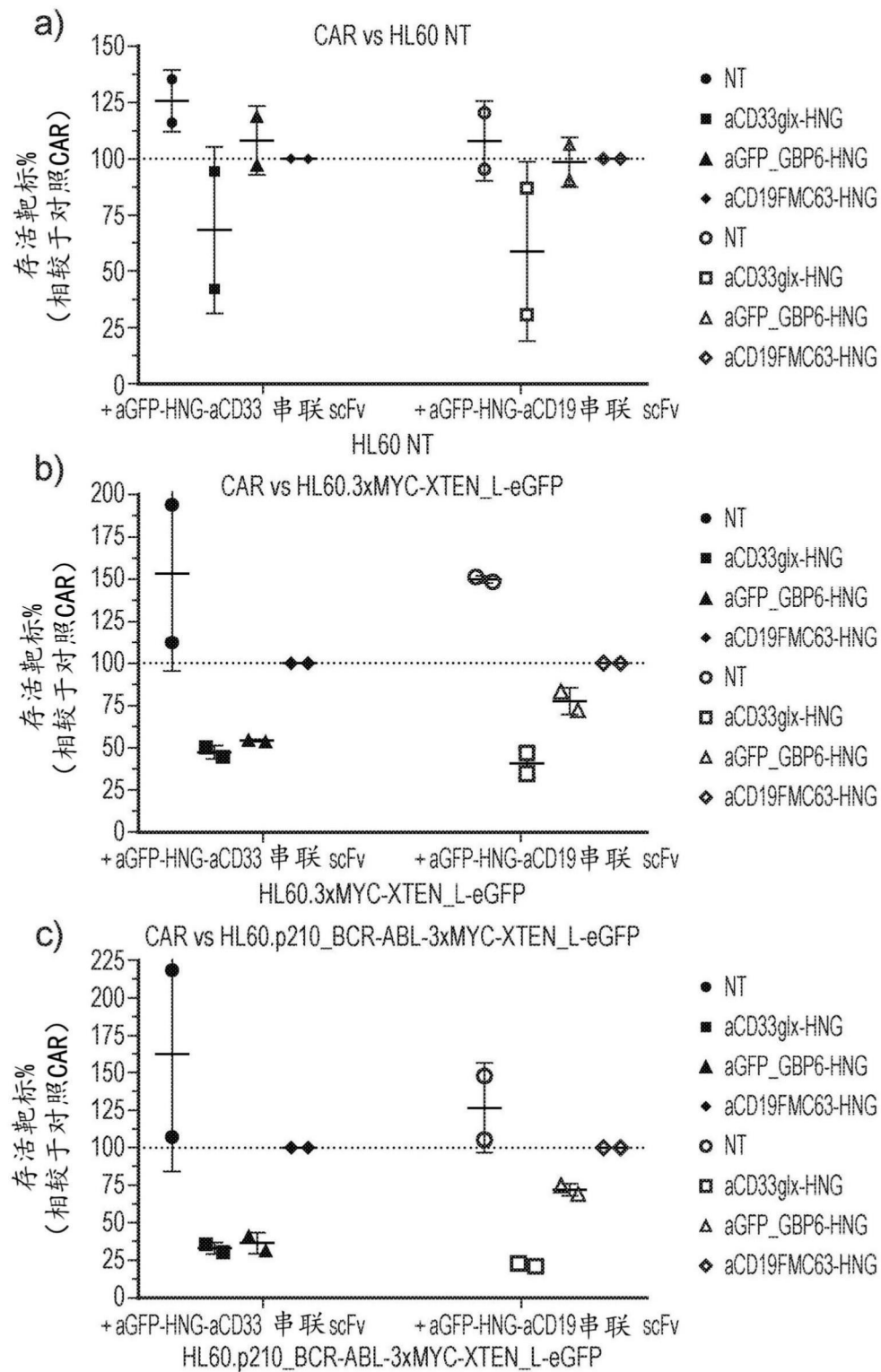


图5

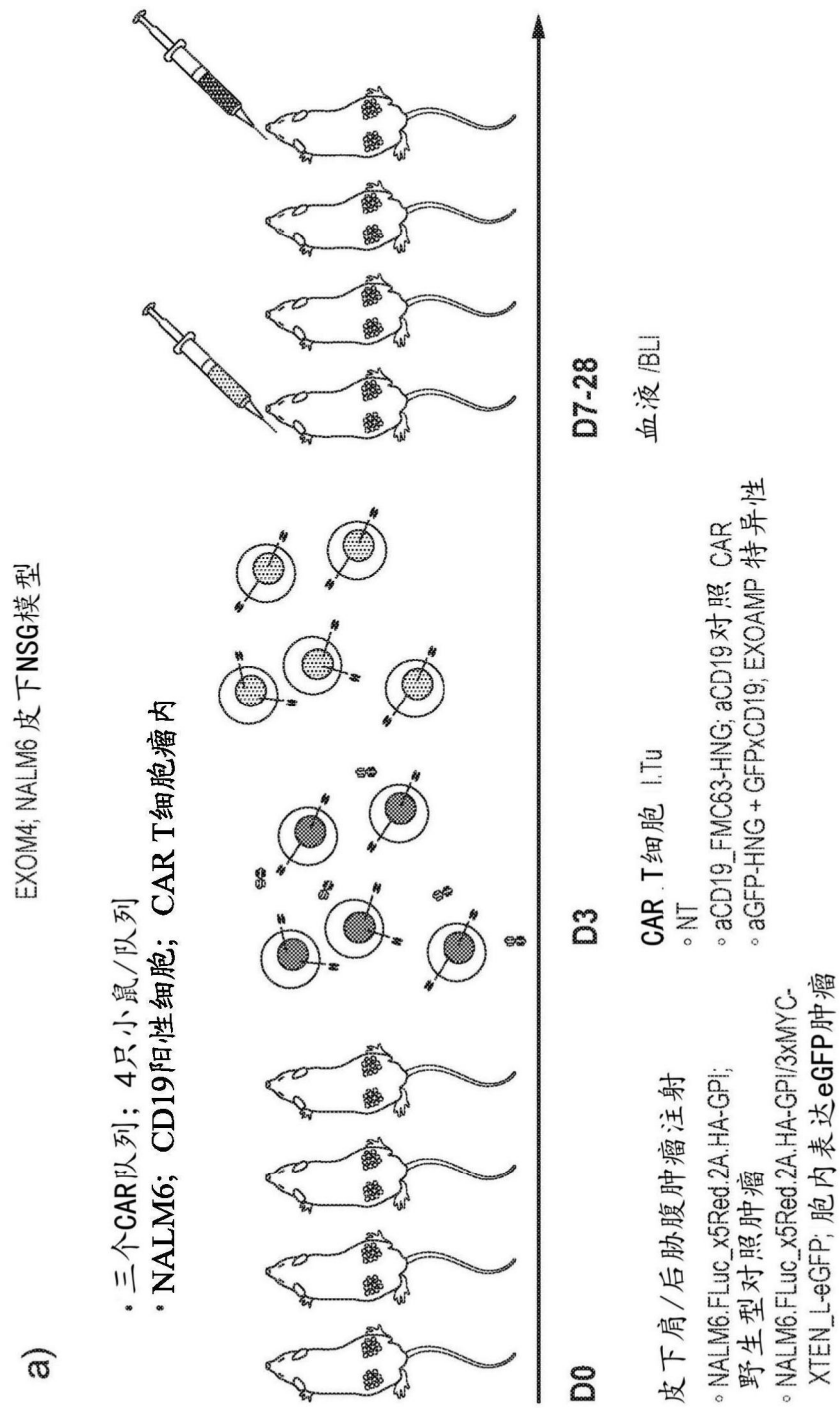


图6

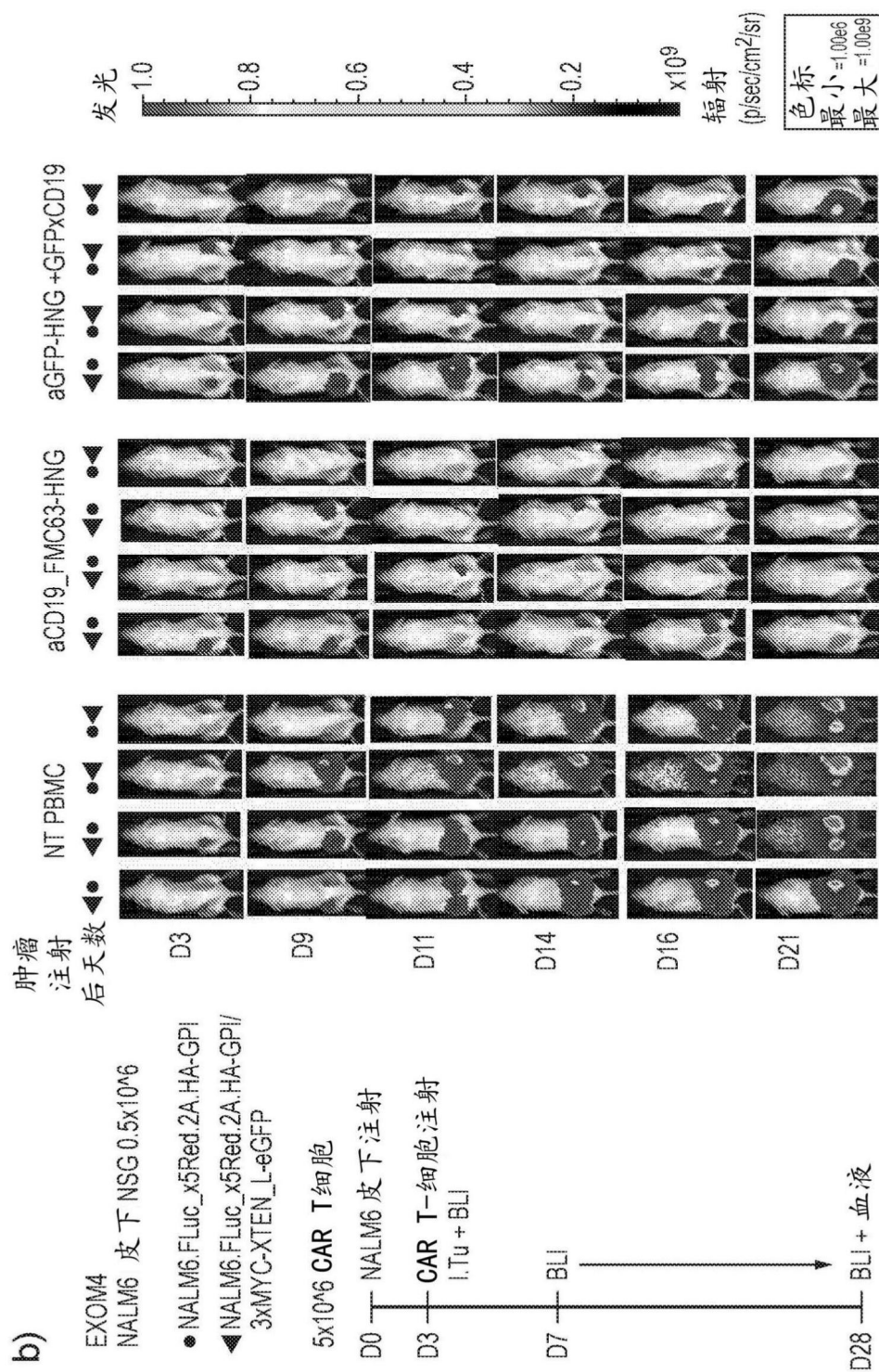


图6(续)

c) EXOM4 NALM6 皮下 NSG

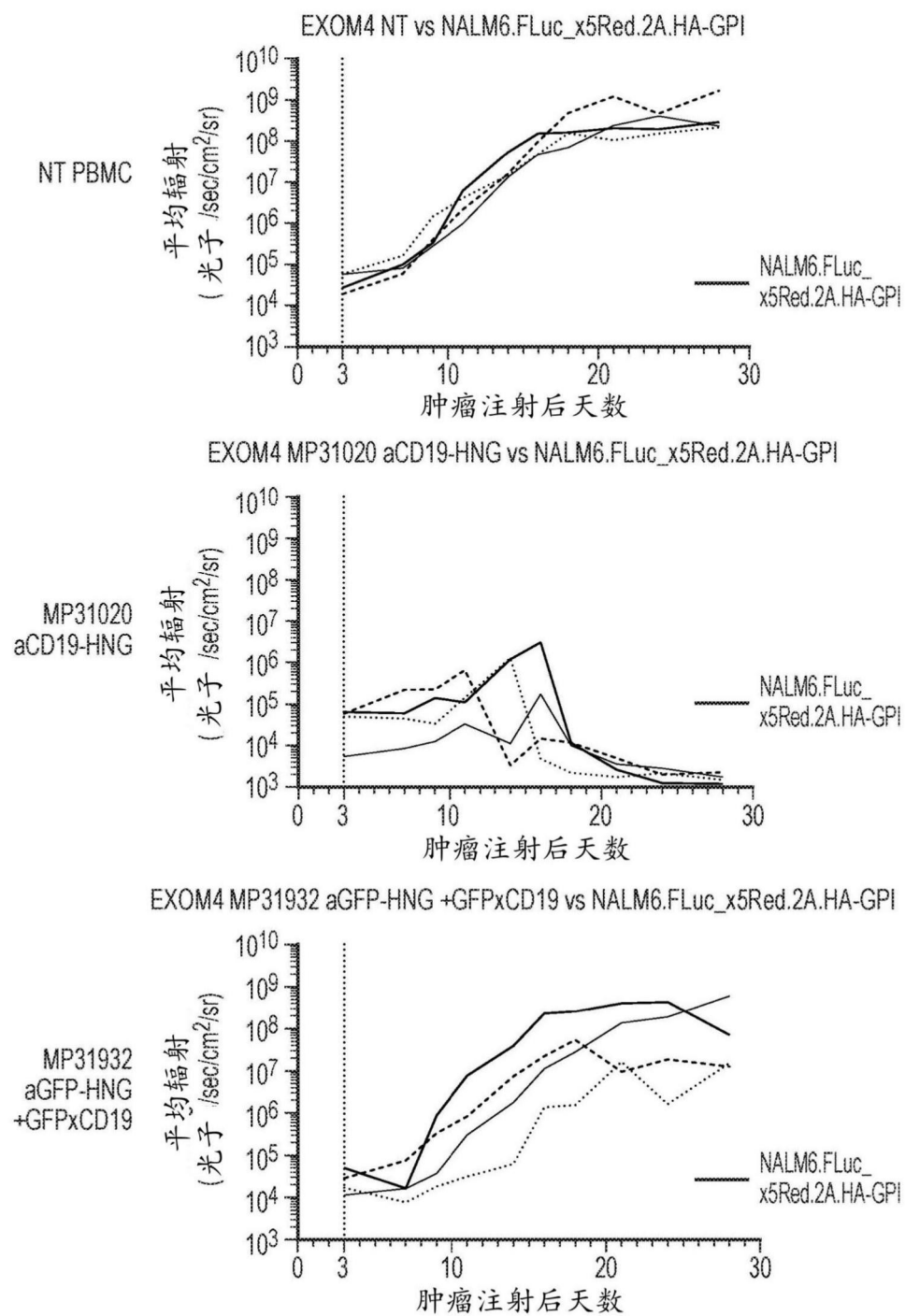


图6(续)

c) EXOM4 NALM6 皮下 NSG

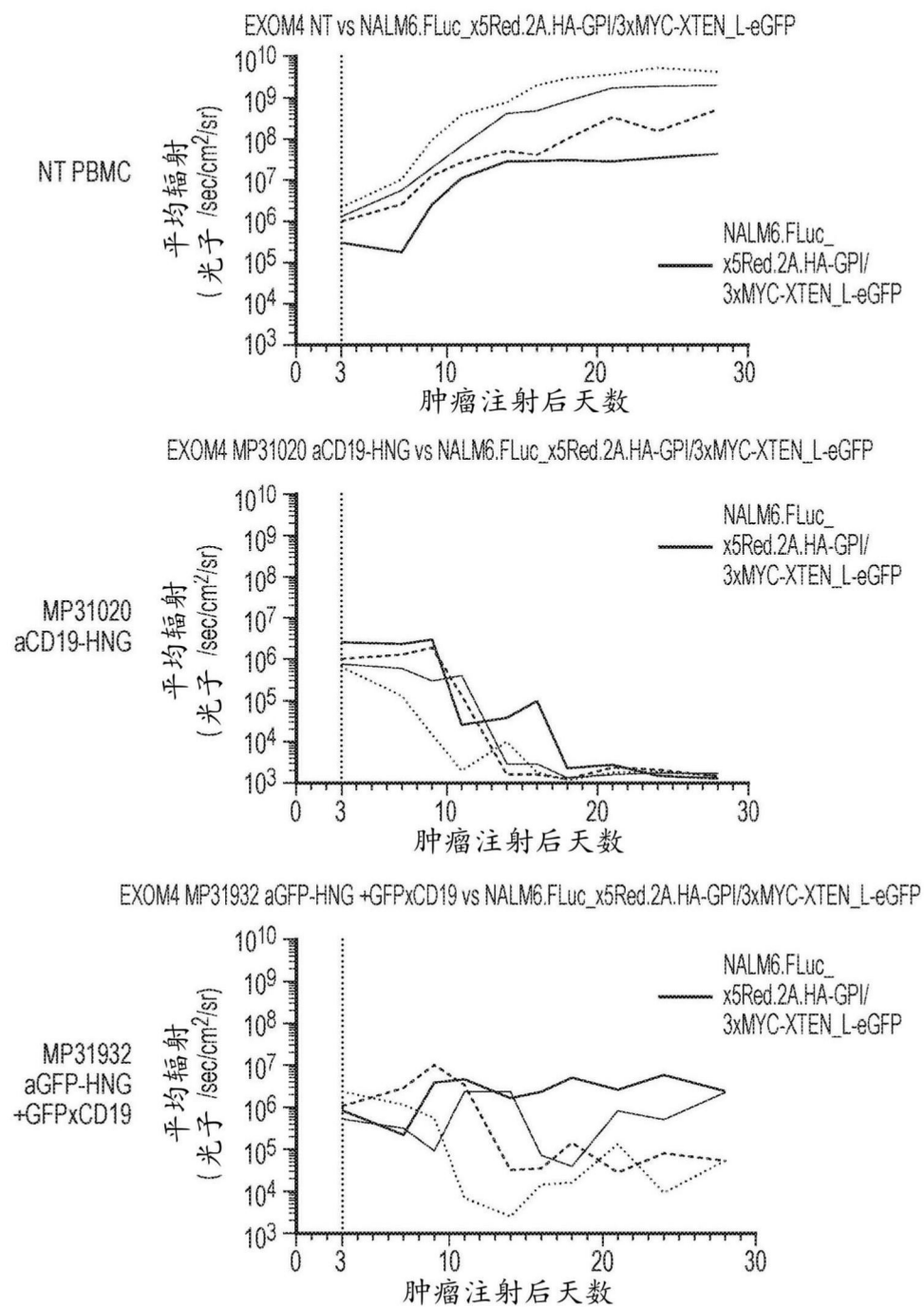


图6(续)

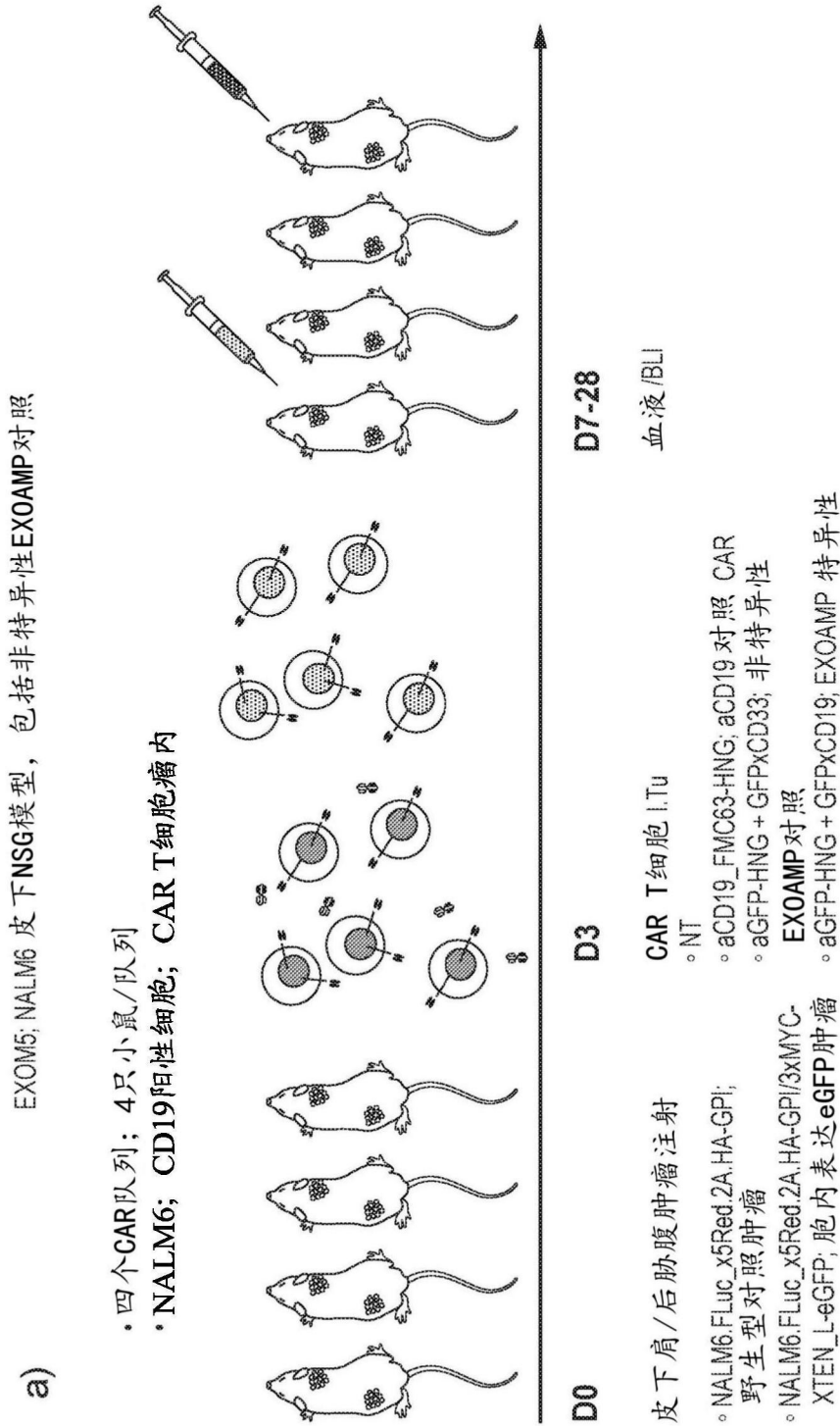


图7

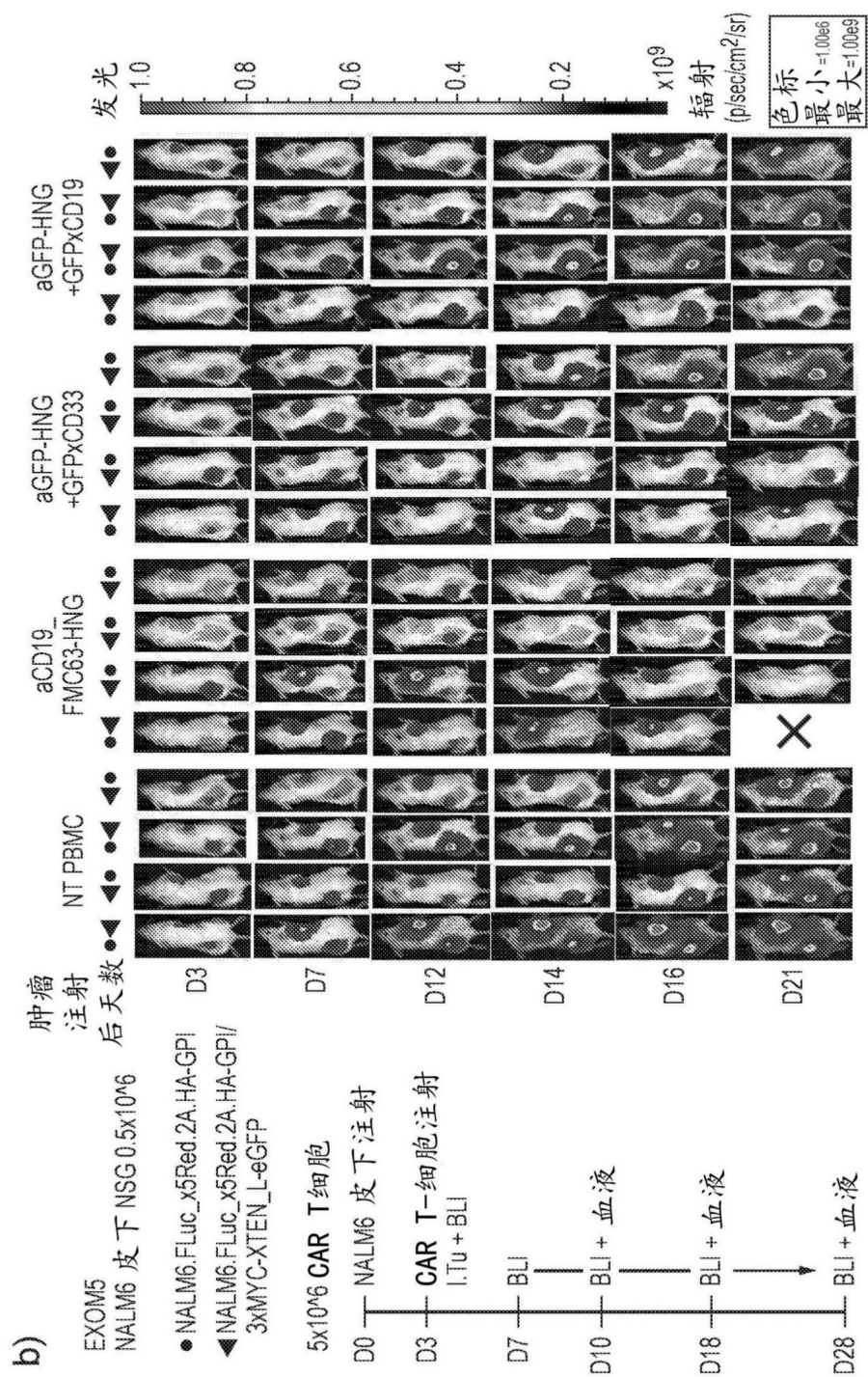


图7(续)

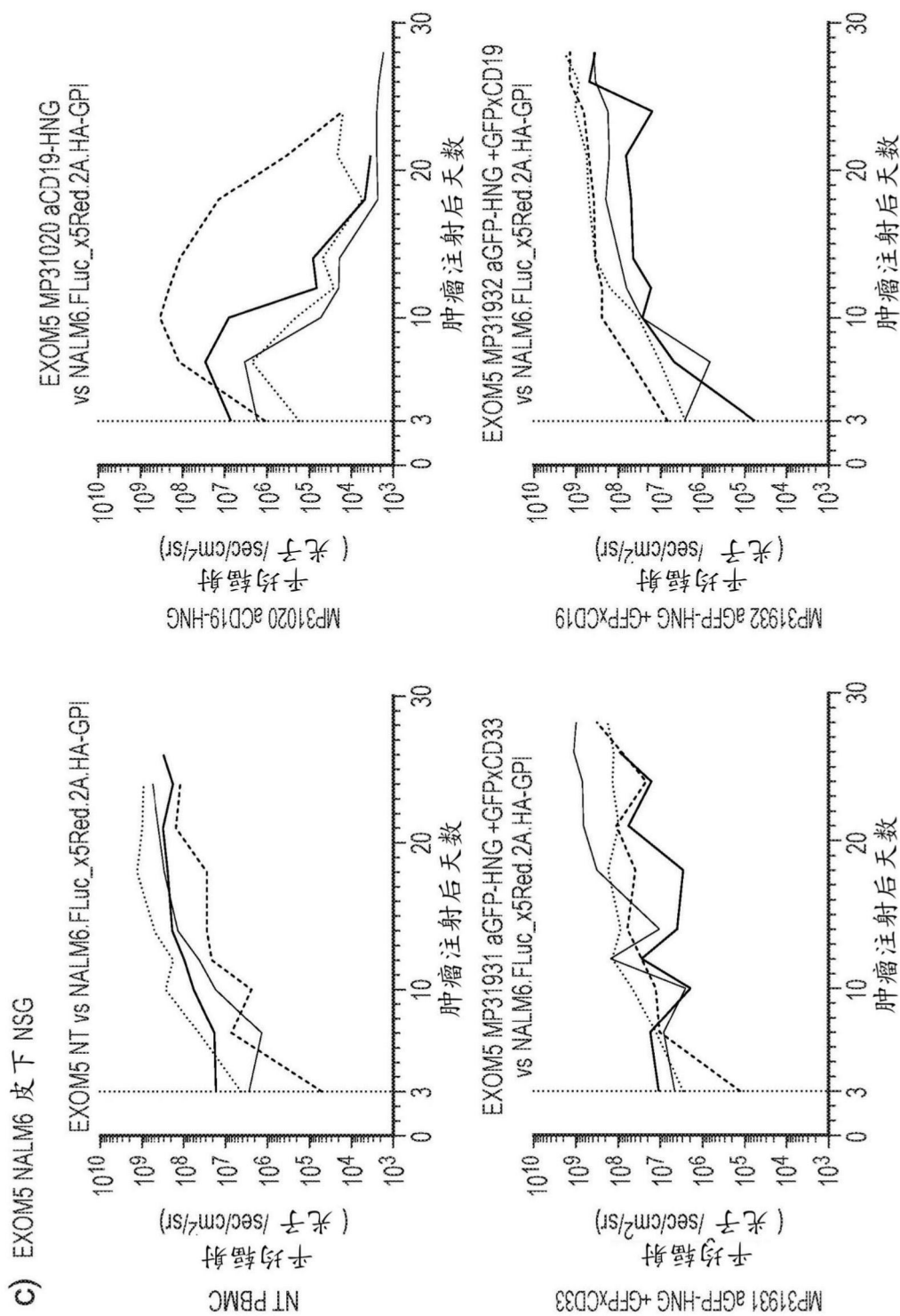


图7(续)

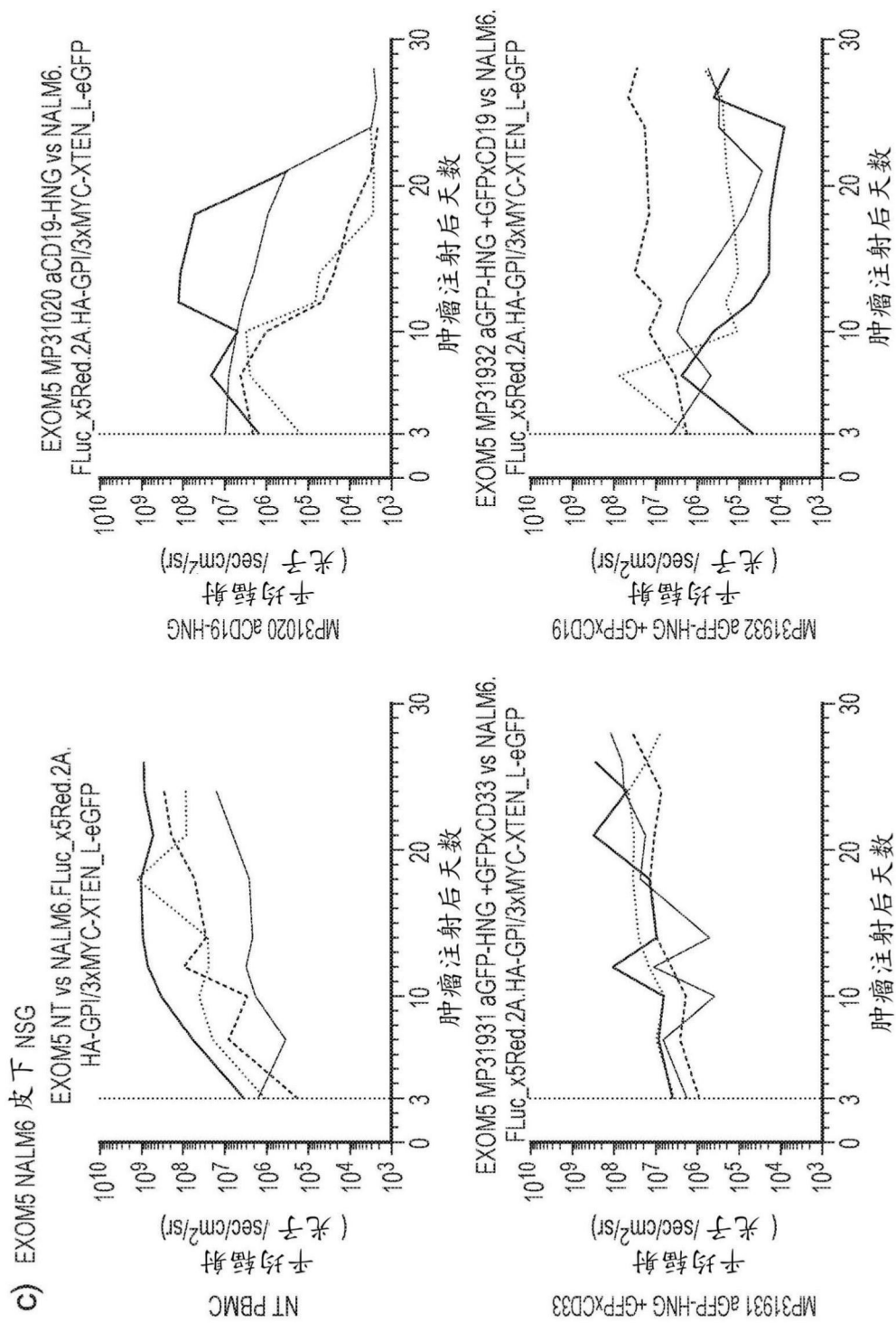


图7(续)

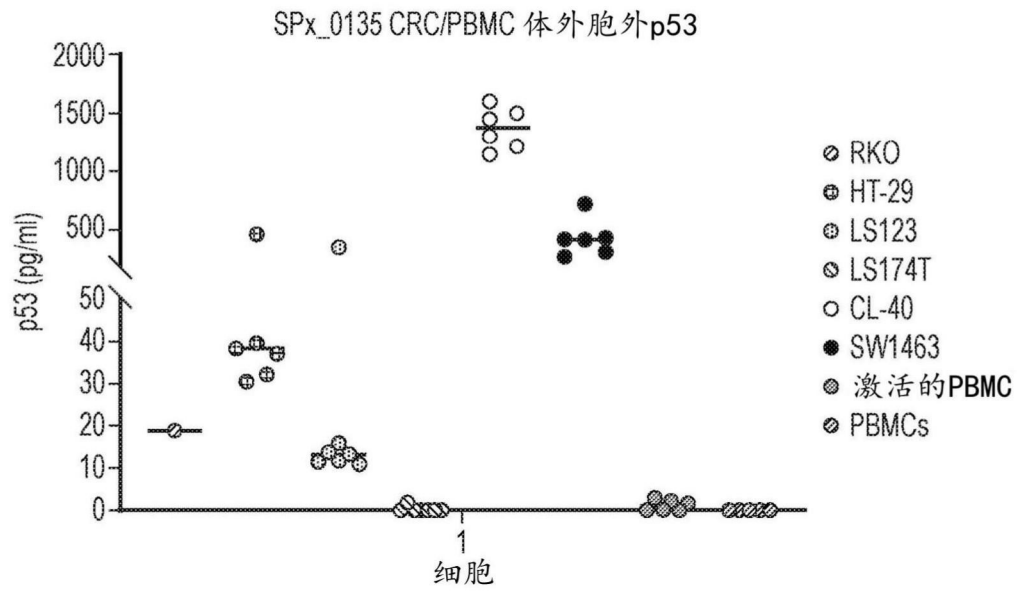


图8

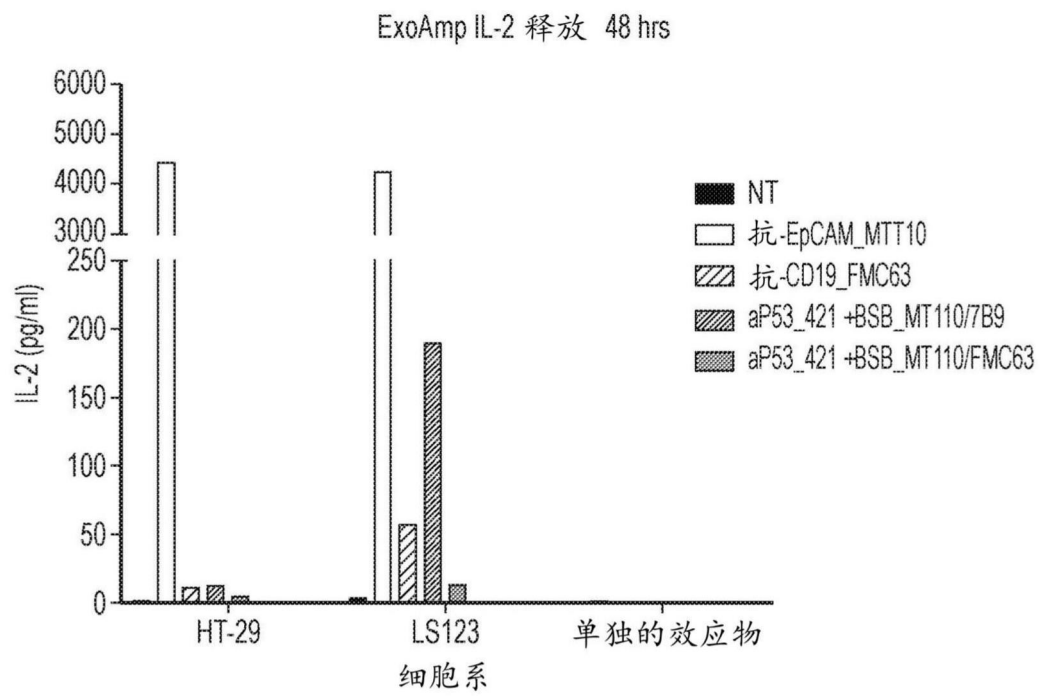


图9

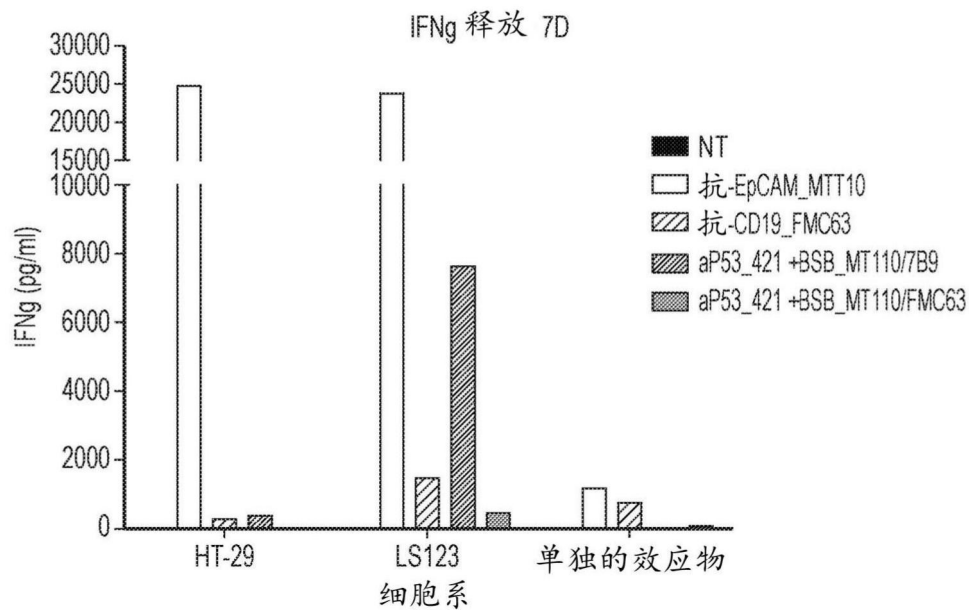
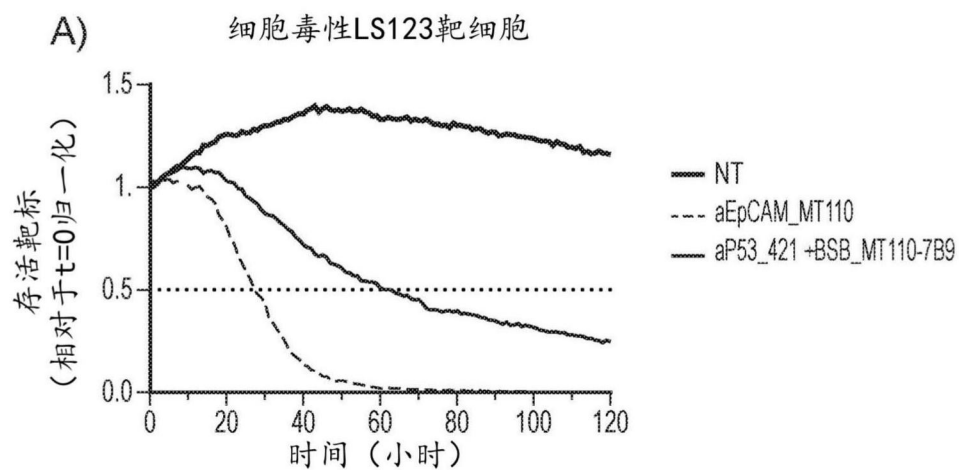


图10



B)

50%杀伤的小时数 (KT ₅₀)	
CAR	KT ₅₀
NT	n/a
aEpCAM_MTT110	27.63
aP53_421+BSB_MTT110-7B9	60.18

图11