(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114206918 A
(43)申请公布日 2022.03.18

(21)申请号 202080035754.4
(22)申请日 2020.03.13
(30)优先权数据
2019107136 2019.03.13 RU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/RU2020/000136 2020.03.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/185121 RU 2020.09.17
(71)申请人 安纳比恩有限责任公司
地址 俄罗斯联邦圣彼得堡
(72)发明人 P·M·格绍维奇
A·V·卡拉贝尔斯基
A·B·优利汀 D·A·马德拉
R·A·伊万诺夫 D·V·莫洛佐夫
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李志强 彭昶
(51)Int.Cl.
C07K 14/705(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/09(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书39页
序列表28页 附图29页

(54)发明名称

嵌合抗原受体的替代细胞内信号传导结构域

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域，具体涉及嵌合抗原受体(CAR)的分离的替代细胞内信号传导结构域、以及包含所述信号传导结构域的嵌合抗原受体(CAR)。本发明还涉及编码嵌合抗原受体的替代细胞内信号传导结构域的核酸、以及编码具有上文提到的信号传导结构域的嵌合抗原受体的核酸、包含上文提到的嵌合抗原受体的表达载体、递送载体以及遗传修饰细胞、以及用于生产所述细胞的方法。

CN 114206918 A

1．一种嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

2．根据权利要求1的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

3.根据权利要求2的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM1由ITGB3取代。

4.根据权利要求2的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM2由ITGB3取代。

5.根据权利要求2的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM3由ITGB3取代。

6．根据权利要求1的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

7.根据权利要求6的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM2和ITAM3由两个ITGB3取代。

8.根据权利要求6的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM1和ITAM3由两个ITGB3取代。

9.根据权利要求6的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM1和ITAM2由两个ITGB3取代。

10．根据权利要求1的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM1具有由SEQ ID NO: 1表示的氨基酸序列。

11．根据权利要求1的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM2具有由SEQ ID NO: 2表示的氨基酸序列。

12．根据权利要求1的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITAM3具有由SEQ ID NO: 3表示的氨基酸序列。

13．根据权利要求1的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITGB3具有由SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列、或者由含有任何1或2个保守取代的SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列。

14．根据权利要求13的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITGB3具有由含有任何1个保守取代的SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列。

15．根据权利要求13的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITGB3具有由含有任何2个保守取代的SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列。

16．根据权利要求13的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其中ITGB3具有由SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列。

17．根据权利要求2的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域，其具有由SEQ ID NO: 5表示的氨基酸序列，或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 5的氨基酸序列具有至少95%同一性，并且与SEQ ID NO: 5的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

18. 根据权利要求2的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 6表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 6的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 6的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

19. 根据权利要求2的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 7表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 7的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 7的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

20. 根据权利要求6的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 8表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 8的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 8的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

21. 根据权利要求6的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 9表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 9的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 9的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

22. 根据权利要求6的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 10表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 10的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 10的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

23. 分离的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包括选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个或两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的一个或两个片段,其中ITAM和ITGB3的总数为三。

24. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包含选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的一个片段。

25.根据权利要求24的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包含ITAM2、ITAM3和ITGB3。

26.根据权利要求24的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包含ITAM1、ITAM3和ITGB3。

27.根据权利要求24的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包含ITAM1、ITAM2和ITGB3。

28. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包含选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

29. 根据权利要求28的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包含ITAM1和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

30. 根据权利要求28的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包含ITAM2和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

31. 根据权利要求28的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其包含ITAM3和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

32. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其中ITAM1具有由SEQ ID NO: 1表示的氨基酸序列。

33. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其中ITAM2

具有由SEQ ID NO: 2表示的氨基酸序列。

34. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其中ITAM3具有由SEQ ID NO: 3表示的氨基酸序列。

35. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其中ITGB3具有由SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列、或者由含有任何1或2个保守取代的SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列。

36. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其中ITGB3具有由含有任何1个保守取代的SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列。

37. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其中ITGB3具有由含有任何2个保守取代的SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列。

38. 根据权利要求23的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其中ITGB3具有由SEQ ID NO: 4表示的氨基酸序列。

39. 根据权利要求24的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 5表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 5的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 5的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

40. 根据权利要求24的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 6表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 6的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 6的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

41. 根据权利要求24的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 7表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 7的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 7的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

42. 根据权利要求28的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 8表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 8的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 8的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

43. 根据权利要求28的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 9表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 9的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 9的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

44. 根据权利要求28的嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域,其具有由SEQ ID NO: 10表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 10的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 10的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

45.一种分离的核酸,其编码根据权利要求1-44的替代细胞内信号传导结构域。

46.一种分离的嵌合抗原受体(CAR),其包含根据权利要求1-44的替代细胞内信号传导结构域。

47.根据权利要求46的分离的嵌合抗原受体(CAR),其包含:

a)对于肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域;

b)跨膜结构域;

c)共刺激结构域;

d)根据权利要求1-44的替代细胞内信号传导结构域。

48.根据权利要求47的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中对于肿瘤抗原特异性的所述抗

原结合结构域是Fab或scFv。

49.根据权利要求48的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中对于肿瘤抗原特异性的所述抗原结合结构域是scFv。

50.根据权利要求47的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述抗原结合结构域对于选自以下的肿瘤抗原是特异性的:CD19、CD20、CD123或BCMA。

51.根据权利要求50的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述抗原结合结构域对于CD19肿瘤抗原是特异性的。

52. 根据权利要求51的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中对于CD19肿瘤抗原是特异性的所述抗原结合结构域具有由SEQ ID NO: 11表示的氨基酸序列。

53. 根据权利要求48的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述跨膜结构域是选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体-α、-β或-ζ链,CD28,CD3 ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。

54.根据权利要求53的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述跨膜结构域是CD8。

55. 根据权利要求54的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述CD8跨膜结构域具有由SEQ ID NO: 12表示的氨基酸序列。

56. 根据权利要求47的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述共刺激结构域是选自以下的蛋白质的功能性信号传导结构域:OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)和4-1BB (CD137)。

57.根据权利要求56的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述共刺激结构域是CD28或4-1BB。

58.根据权利要求57的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述共刺激结构域是CD28。

59. 根据权利要求58的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述CD28共刺激结构域具有由SEQ ID NO: 13表示的氨基酸序列。

60.根据权利要求56的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述共刺激结构域是4-1BB。

61. 根据权利要求60的分离的嵌合抗原受体(CAR),其中所述4-1BB共刺激结构域具有由SEQ ID NO: 14表示的氨基酸序列。

62.根据权利要求46的分离的嵌合抗原受体(CAR),其进一步包含前导序列。

63. 根据权利要求46的分离的嵌合抗原受体(CAR),其具有由选自以下的氨基酸序列表示的氨基酸序列:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26,或者具有与选自以下的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26,并且与选自以下的氨基酸序列不同之处仅在于非保守的氨基酸残基:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26。

64.一种分离的核酸,其编码根据权利要求46-63的分离的嵌合抗原受体(CAR)。

65.一种表达载体,其包含根据权利要求64的核酸。

66.一种递送载体,其包含根据权利要求64的核酸。

67.根据权利要求65-66的载体,其选自DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

68.根据权利要求65-66的载体,其进一步包含启动子。

69.根据权利要求65-66的载体,所述载体是体外转录的载体。

70.根据权利要求65-66的载体,其中所述核酸序列进一步包含聚(A)序列。

71.根据权利要求65-66的载体,其中所述核酸序列进一步包含3'UTR。

72.一种用于生产包含根据权利要求46-63的嵌合抗原受体(CAR)的遗传修饰细胞的方法,所述方法包括通过根据权利要求65-71的载体转化所述细胞。

73.一种包含根据权利要求46-63的嵌合抗原受体(CAR)的遗传修饰细胞,所述遗传修饰细胞使用根据权利要求72的方法产生。

74.根据权利要求73的细胞,其中所述细胞是T淋巴细胞。

75. 根据权利要求73的细胞,其中所述细胞是CD8+ T细胞。

76.根据权利要求73的细胞,其中所述细胞是NK细胞。

77.根据权利要求73的细胞,其用作药用剂。

78.根据权利要求77的细胞,其用作用于肿瘤疾病的药用剂。

79.根据权利要求78的细胞,其用作用于其中所述肿瘤是癌症的疾病的药用剂。

嵌合抗原受体的替代细胞内信号传导结构域

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及嵌合抗原受体(CAR)的分离的替代细胞内信号传导结构域、以及包含所述信号传导结构域的嵌合抗原受体(CAR)。本发明还涉及编码嵌合抗原受体的替代细胞内信号传导结构域的核酸、以及编码具有上文提到的信号传导结构域的嵌合抗原受体的核酸、包含上文提到的嵌合抗原受体的表达载体、递送载体以及遗传修饰细胞、以及用于生产所述细胞的方法。

背景技术

[0002] 嵌合抗原受体(CAR)是靶向细胞表面抗原的重组蛋白质分子(Sadelain M,Brentjens R,Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. Curr Opin Immunol [Internet]. 2009;21:215-23. 可得自:http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791509000211)。

[0003] CAR一般由执行特定功能的几个结构域组成。CAR的细胞外结构域通常由对于肿瘤抗原特异性的抗体的单链可变片段(单链可变片段,scFv)表示,并且提供不依赖于主要组织相容性复合物分子的靶识别。当与靶抗原结合并有效激活表达CAR的免疫细胞时,细胞内结构域负责信号转导。受体的细胞内部分由CD3ζ-链(CD3-zeta链)以及通常衍生自天然蛋白质CD28和4-1BB的另外的共刺激结构域组成。发现与其细胞内部分仅由CD3ζ链(CD3-zeta链)组成的CAR相比,CAR受体中的共刺激结构域的存在显著增加了表达CAR的免疫细胞的活性(Maher J,Brentjens RJ,Gunset G,Rivière I,Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRζ /CD28 receptor. Nat Biotechnol [Internet]. 2002;20:70-5. 可得自:http://www.nature.com/articles/nbt0102-70;Imai C,Mihara K,Andreansky M,Nicholson IC,Pui C-H,Geiger TL等人Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. Leukemia [Internet]. 2004;18:676-84. 可得自:http://www.nature.com/articles/2403302;Kowolik CM,Topp MS,Gonzalez S,Pfeiffer T,Olivares S,Gonzalez N等人CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. Cancer Res. 2006;66:10995-1004)。

[0004] CAR受体设计的两种变动在临床前和临床研究中均显示了显著的抗肿瘤活性和高功效(Sadelain M,Brentjens R,Rivi?re I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. Cancer Discov [Internet]. 2013;3:388-98. 可得自:http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-12-0548)。已显示了,含有CD28和4-1BB的共刺激结构域的CAR受体之间存在显著差异。

[0005] 在淋巴组织增生性疾病的治疗中使用CD19特异性CAR-T疗法获得的临床研究结果显示了,与当使用CD28-CD3ζ CAR (CD3-zeta链)时相比,4-1BB-CD3ζ (CD3-zeta链) CAR提

供了CAR-T淋巴细胞在体内的更长持久性(对于大多数患者超过6个月),并且它的使用致使更不明显的细胞因子释放综合征(Davila ML,Riviere I,Wang X,Bartido S,Park J,Curran K等人Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Sci Transl Med [Internet]. 2014;6:224ra25-224ra25. 可得自:http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.3008226;Maude SL. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. N Engl J Med [Internet]. 2014;371:1507-17. 可得自:http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1407222%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25317870;Zhang T,Cao L,Xie J,Shi N,Zhang Z,Luo Z等人Efficiency of CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for treatment of B cell malignancies in phase I clinical trials: a meta-analysis. Oncotarget [Internet]. 2015;6:33961-71. 可得自:http://www.oncotarget.com/fulltext/5582)。

[0006] 根据累积数据,与当使用4-1BB-CD3ζ (CD3-zeta链) CAR时相比,CD28-CD3ζ (CD3-zeta链) CAR受体可以提供CAR-T淋巴细胞的更早激活,这是由于细胞因子的释放和明显的细胞毒性效应(van der Stegen SJC,Hamieh M,Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. Nat Rev Drug Discov [Internet]. Nature Publishing Group;2015;14:499-509. 可得自:http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd4597),该事实继而可能提供增加的治疗效果。

[0007] CAR-T细胞的激活水平和细胞因子的释放的适度降低,同时维持激活信号通过基于CD28的共刺激结构域的转导率而无细胞毒性活性的丧失,致使基于表达CD28 - CD3ζ (CD3-zeta链) CAR受体的免疫细胞的肿瘤疾病的过继免疫疗法的治疗性质的显著改善。

[0008] 天然T细胞受体(TCR)与主要组织相容性复合物(MHC)组分的相互作用,进一步导致CD8共受体的结合和LcK酪氨酸激酶的激活。后者使CD3ζ (CD3-zeta链)内的肽序列(即,基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM))磷酸化。Zap-70激酶经由Src同源2(SH2)结构域与CD3ζ (CD3-zeta链)内的双重磷酸化ITAM相互作用。Zap-70与CD3ζ (CD3-zeta链)的结合导致激酶构象的变化及其在氨基酸残基Y315和Y319处的自磷酸化。Lck介导的磷酸化和反式自磷酸化诱导Zap70的激活。在激活之后,Zap70停止与CD3ζ (CD3-zeta链)相互作用并与质膜缔合,在所述质膜中,它继而使其它底物蛋白质磷酸化,所述其它底物蛋白质包括LAT20[Yamasaki S,Takamatsu M,Iwashima M,The kinase,SH3,and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization,Mol Cell Biol. 1996 Dec;16(12):7151-60;Visco C,Magistrelli G,Bosotti R,Perego R,Rusconi L,Toma S,Zamai M,Acuto O,Isacchi A,Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding,Biochemistry. 2000 Mar 14;39(10):2784-91.]。

[0009] 因此,Zap-70是CAR信号传导途径中的关键成员;因此,该激酶活性的调控可能是用于调控CAR-T的激活水平的方法之一,这直接影响其活力、持久性和功能活性。众多研究已揭示了ZAP70-ITAM相互作用系统的主要结构和功能元件[Katz ZB,Novotná L,Blount A,Lillemeier BF,A cycle of Zap70 kinase activation and release from the TCR

amplifies and disperses antigenic stimuli,Nat Immunol. 2017 Jan;18(1):86-95; Deindl S,Kadlecek TA,Cao X,Kuriyan J,Weiss A,Stability of an autoinhibitory interface in the structure of the tyrosine kinase ZAP-70 impacts T cell receptor response,Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 8;106(49):20699-704; Szabo M,Czompoly T,Kvell K,Talaber G,Bartis D,Nemeth P,Berki T,Boldizsar F, Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells,Int Immunol. 2012 Feb;24(2):79-87.]。

[0010] 通过产生Zap-70的杂合肽底物,CAR活性的调控看起来是可能的,所述底物不同于基于CD3ζ (CD3-zeta链)的CAR激活结构域内的天然ITAM。候选物之一是整联蛋白β3中的氨基酸序列的片段(整联蛋白β3的细胞质尾部;ITGB3) [Liu XY,Timmons S,Lin YZ,Hawiger J.,Identification of a functionally important sequence in the cytoplasmic tail of integrin beta 3 by using cell-permeable peptide analogs,Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 15;93 (21):11819-24;Durrant TN,van den Bosch MT,Hers I,Integrin αIIbβ3 outside-in signaling,Blood. 2017 Oct 5;130(14):1607-1619]。

[0011] 本发明的作者已意外地发现,嵌合抗原受体(CAR)细胞质部分的杂合信号传导结构域刺激表达相应遗传构建体的遗传修饰的免疫细胞的CAR依赖性激活,所述杂合信号传导结构域包括整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的肽片段,代替在嵌合抗原受体(CAR)的细胞内信号传导结构域(例如CD3ζ (CD3-zeta))内,选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个或两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。

发明内容

[0012] 在一个方面,本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)的分离的替代细胞内信号传导结构域,其中选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个或两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

[0013] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

[0014] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM1由ITGB3取代。

[0015] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM2由ITGB3取代。

[0016] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM3由ITGB3取代。

[0017] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

[0018] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM2和ITAM3由两个ITGB3取代。

[0019] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在

于,ITAM1和ITAM3由两个ITGB3取代。

[0020] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM1和ITAM2由两个ITGB3取代。

[0021] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM1具有氨基酸序列APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR (SEQ ID NO: 1)。

[0022] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM2具有氨基酸序列PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM (SEQ ID NO: 2)。

[0023] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM3具有氨基酸序列ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ (SEQ ID NO: 3)。

[0024] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT SEQ ID NO: 4)、或者含有任何1或2个保守取代的氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT SEQ ID NO: 4)。

[0025] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有含有任何1个保守取代的氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)。

[0026] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有含有任何2个保守取代的氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT(SEQ ID NO: 4)。

[0027] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)。

[0028] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 5),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 5的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 5的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0029] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 6),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 6的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 6的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0030] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 7),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 7的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 7的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0031] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 8),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 8的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 8的不同之处仅在于非保守的氨基

酸残基。

[0032] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 9),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 9的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 9的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0033] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 10),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 10的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 10的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0034] 在一个方面,本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)的分离的替代细胞内信号传导结构域,其包括选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个或两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的一个或两个片段,其中ITAM和ITGB3的总数为三。

[0035] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的一个片段。

[0036] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM2、ITAM3和ITGB3。

[0037] 在一些实施方案中,替代的细胞内信号传导结构域包括ITAM1、ITAM3和ITGB3。

[0038] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM1、ITAM2和ITGB3。

[0039] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

[0040] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM1和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

[0041] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM2和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

[0042] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM3和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

[0043] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM1具有氨基酸序列APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR (SEQ ID NO: 1)。

[0044] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM2具有氨基酸序列PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM (SEQ ID NO: 2)。

[0045] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM3具有氨基酸序列ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ (SEQ ID NO: 3)。

[0046] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在

于,ITGB3具有氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)、或者含有任何1或2个保守取代的氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)。

[0047] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有含有任何1个保守取代的氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)。

[0048] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有含有任何2个保守取代的氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT(SEQ ID NO: 4)。

[0049] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有氨基酸序列DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)。

[0050] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 5),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 5的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 5的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0051] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 6),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 6的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 6的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0052] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 7),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 7的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 7的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0053] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 8),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 8的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 8的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0054] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 9),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 9的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 9的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0055] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 10),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 10的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 10的不同之处仅在于非保守

的氨基酸残基。

[0056] 在一个方面，本发明涉及分离的核酸，其编码上文提到的替代细胞内信号传导结构域。

[0057] 在一个方面，本发明涉及分离的嵌合抗原受体(CAR)，其包含上文提到的替代细胞内信号传导结构域。

[0058] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，它包含：

a)对于肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域；

b)跨膜结构域；

c)共刺激结构域；

d)替代的细胞内信号传导结构域。

[0059] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，对于肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域是Fab或scFv。

[0060] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，对于肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域是scFv。

[0061] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，抗原结合结构域对于选自以下的肿瘤抗原是特异性的：CD19、CD20、CD123或BCMA。

[0062] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，抗原结合结构域对于CD19肿瘤抗原是特异性的。

[0063] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，对于CD19肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域具有氨基酸序列DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 11)。

[0064] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，跨膜结构域是选自以下的蛋白质的跨膜结构域：T细胞受体-α、-β或-ζ链，CD28，CD3 ε，CD45，CD4，CD5，CD8，CD9，CD16，CD22，CD33，CD37，CD64，CD80，CD86，CD134，CD137和CD154。

[0065] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，跨膜结构域是CD8。

[0066] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，CD8的跨膜结构域具有由IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 12)表示的氨基酸序列。

[0067] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，共刺激结构域是选自以下的蛋白质的功能性信号传导结构域：OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS (CD278)和4-1BB (CD137)。

[0068] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，共刺激结构域是CD28或4-1BB。

[0069] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，共刺激结构域是CD28。

[0070] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，CD28共刺激结构域具有氨基酸序列AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE

EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR (SEQ ID NO: 13)。

[0071] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,共刺激结构域是4-1BB。

[0072] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,4-1BB的共刺激结构域具有由KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 14)表示的氨基酸序列。

[0073] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,它进一步包含前导序列。

[0074] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)具有由选自以下的氨基酸序列表示的氨基酸序列:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26,或者具有与选自以下的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26,并且与选自以下的氨基酸序列不同之处仅在于非保守的氨基酸残基:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26。

[0075] 嵌合抗原受体19CAR-T-CD28-altcd3ζ (ITGB3- ITAM2- ITAM3)具有氨基酸序列 MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 15)。

[0076] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITAM1- ITGB3- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK DTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 16)。

[0077] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITAM1- ITAM2- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK

LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 17)。

[0078] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITGB3- ITGB3- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKDTANNP
LYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 18)。

[0079] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITAM1- ITGB3- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
DTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 19)。

[0080] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITGB3- ITAM2- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 20)。

[0081] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITGB3- ITAM2- ITAM3)具有氨基酸序

列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 21)。

[0082] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITAM1- ITGB3- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 22)。

[0083] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITAM1- ITAM2- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 23)。

[0084] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITGB3- ITGB3- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 24)。

[0085] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITAM1- ITGB3- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGDTA
NNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 25)。

[0086] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITGB3- ITAM2- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 26)。

[0087] 在一个方面,本发明涉及分离的核酸,其编码上文提到的分离的嵌合抗原受体(CAR)。

[0088] 在一个方面,本发明涉及包含上述核酸的表达载体。

[0089] 在一个方面,本发明涉及包含上述核酸的递送载体。

[0090] 在一些实施方案中,载体选自DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

[0091] 在一些实施方案中,载体进一步包含启动子。

[0092] 在一些实施方案中,载体是体外转录的载体。

[0093] 在一些实施方案中,核酸序列进一步包含聚(A)序列。

[0094] 在一些实施方案中,核酸序列进一步包含3'UTR。

[0095] 在一个方面,本发明涉及用于产生包含上述嵌合抗原受体(CAR)的遗传修饰细胞的方法,其包括通过上述方法转化细胞。

[0096] 在一个方面,本发明涉及包含上述嵌合抗原受体(CAR)的遗传修饰细胞,其通过上述方法产生。

[0097] 在一些实施方案中,细胞是T淋巴细胞。

[0098] 在一些实施方案中,细胞是CD8+ T细胞。

[0099] 在一些实施方案中,细胞是NK细胞。

[0100] 在一些实施方案中,细胞用作药用剂。

[0101] 在一些实施方案中,细胞用作用于肿瘤疾病的药用剂。

[0102] 在一些实施方案中,细胞用作用于其中肿瘤是癌症的疾病的药用剂。

附图说明

[0103] 图1. 载体pCDH-19CAR-T-ITGB3-ITGB3-eGFP的图谱。

[0104] 图2. 表达盒19CAR-T-ITGB3-ITGB3-eGFP的示意图。

[0105] 图3. 载体pCDH-19CAR-T-ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP的图谱。

[0106] 图4. 表达盒19CAR-T-ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP的示意图。

[0107] 图5. 载体pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP的图谱。

[0108] 图6. 表达盒19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP的示意图。

[0109] 图7. 载体pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP的图谱。

[0110] 图8. 表达盒19CAR-T-ITAM1- ITAM2-ITGB3-eGFP的示意图。

[0111] 图9. 载体pCDH-CAR-T-GFP的图谱。

[0112] 图10．表达盒pCDH-CAR-T-GFP的示意图。

[0113] 图11．载体pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP的图谱。

[0114] 图12．表达盒pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP的示意图。

[0115] 图13．载体pCDH-19CAR-T -ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP的图谱。

[0116] 图14．表达盒pCDH-19CAR-T -ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP的示意图。

[0117] 图15．载体pCDH-19CAR-T_CD28-ITGB3-ITGB3-eGFP的图谱。

[0118] 图16．表达盒pCDH-19CAR-T_CD28-ITGB3-ITGB3-eGFP的示意图。

[0119] 图17．载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP的图谱。

[0120] 图18．表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP的示意图。

[0121] 图19．载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP的图谱。

[0122] 图20．表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP的示意图。

[0123] 图21．载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP的图谱。

[0124] 图22．表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP的示意图。

[0125] 图23．载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP的图谱。

[0126] 图24．表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP的示意图。

[0127] 图25．载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP的图谱。

[0128] 图26．表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP的示意图。

质粒的结构特征(cn)	
元件	备注
RSV 启动子	劳斯肉瘤病毒的增强子/启动子
遗传元件(HIV-1 Ψ、cPPT、Gag、Env、LTRs)	用于将病毒表达构建体包装、转导和稳定整合到基因组 DNA 内的元件。
5' LTR (截短的)	来自 HIV-1 的截短的 5'长末端重复(LTR)
HIV LTR	来自 HIV-1 的长末端重复(LTR)
HIV-1 Ψ	HIV-1 包装信号
Gag	编码逆转录病毒的核心结构蛋白的群特异性抗原。
Env	编码病毒包膜的病毒基因。
RRE	负责将 RNA 与 Rev 蛋白结合并将核蛋白从核导向细胞质的元件。
cPPT	HIV-1 的中央多聚嘌呤区和中央终止序列。
EF1 启动子	人翻译延伸因子 EF-1α 的强组成型启动子
ScFv	单链可变片段
SVH	重链可变结构域
SVL	轻链可变结构域
GS-接头	甘氨酸-丝氨酸接头
CD8 4-1BB CD3	嵌合抗原受体 4-1BB，一种由 CD8+ T 细胞表达的共刺激分子
4-1BB	共刺激结构域
CD28	共刺激结构域
T2A	来自明脉扁刺蛾(Thosea asigna)病毒衣壳蛋白的 2A 寡肽，其在真核细胞中的翻译期间介导多肽的切割。
eGFP	对于在哺乳动物细胞中的表达进行密码子优化的绿色荧光蛋白基因。
WPRE	WHV 的转录后调控元件
3' LTR (ΔU3)	来自 HIV-1 的自失活 3'长末端重复(LTR)
HIV LTR	来自 HIV 的长末端重复
SV40 聚(A)信号	SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori	哺乳动物细胞中的 SV40 复制起点
M13 rev	通用测序引物

Lac 操纵子	用于抑制大肠杆菌中的转录的操纵子
lac 启动子	lac 操纵子的启动子
CAP 结合位点	大肠杆菌(E. coli)的分解代谢物操纵子激活蛋白结合位点
ori	细菌细胞中的高拷贝数的 ColE1/pMB1/pBR322/pUC 复制起点。
AmpR	提供对氨苄青霉素、羧苄青霉素的抗性的 β-内酰胺酶基因
AmpR 启动子	Bla 启动子，用于在细菌细胞中表达氨苄青霉素抗性基因的弱组成型启动子。
ITAM1/2/3	基于免疫受体酪氨酸的激活基序
ITGB3	人整联蛋白 β-3 (β3)或 CD6 的基因

[0129] 图27．在慢病毒药物转导之后，在活T淋巴细胞中的GFP表达水平，72小时，%。

[0130] 图28．当与靶细胞共培养时，表达对照CAR-ITAMx3和实验性CAR-ITAMx2-ITGB3x1的CAR-T淋巴细胞的细胞毒性活性的测量。

[0131] A．是当共培养0小时和72小时时，T淋巴细胞/CAR-T淋巴细胞和Raji细胞百分比的趋势；

B．是当T淋巴细胞/CAR-T淋巴细胞与靶细胞共培养72小时时，培养基中的IFN-γ浓度；

C．是当T淋巴细胞/CAR-T淋巴细胞与靶细胞共培养72小时时，培养基中的IL2浓度。

[0132] 图29．依据在Jurkat$^{\Delta TCRab}$ NFAT-GFP报告细胞系中，72小时诱导NFAT信号传导级联的能力，比较对照CAR-ITAMx3和实验性CAR-ITAMx2-ITGB3x1的遗传构建体的功能活性。

具体实施方式

[0133] 定义和一般方法

除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与由本领域普通技术人员通常理解相同的含义。

[0134] 进一步地，除非上下文另有要求，否则单数术语应该包括复数，而复数术语应该包括单数术语。通常，本文所述的细胞培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、分析化学、有机合成化学、医学和药物化学、以及蛋白质和核酸的杂交和化学的当前分类和方法是本领域技术人员众所周知且广泛使用的。酶反应和纯化方法根据制造商的说明书执行，如本领域常见的或如本文所述的。

[0135] “哺乳动物”指归类为哺乳动物的任何动物，包括灵长类动物、人、啮齿类动物、犬、猫、牛、小牛、马、猪等。

[0136] “分离的”意指从天然状态改变或取出。例如，天然存在于动物中的核酸或肽不是“分离的”，但与其天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在，或者可以存在于非天然环境，例如遗传修饰细胞中。

[0137] 术语“同一性”或“同源性”被解释为意指在比对序列，并且在必要时引入缺口以实现整个序列的最大同一性百分比之后，并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的部分，候选序列中与它与之比较的相应序列的残基相同的氨基酸残基的百分比。N-或C-末端延伸或插入均不被解释为降低同一性或同源性。用于比对的方法和计算机程序是本领域众所周知的。可以使用序列分析软件(例如，Sequence Analysis Software Package，Genetics Computer Group，University of Wisconsin Biotechnology Center，1710 University Ave.，Madison，WI 53705)测量序列同一性。这个软件通过对各种取代、缺失(消除)和其它修饰指定一定程度的同源性来匹配相似的序列。

[0138] 如本文使用的，术语“抗原”或“Ag”被定义为激发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生，或特定免疫活性T细胞(immunologically-competent T cells)的激活，或两者。技术人员将了解任何大分子，包括几乎所有蛋白质或肽，都可以充当抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组DNA。技术人员将了解，包含编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码“抗原”，如该术语在本说明书中使用

的。此外，本领域技术人员将了解抗原无需单独由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是，作为非限制性实例，本发明涉及多于一种基因的部分核苷酸序列的使用，并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫应答。此外，技术人员将了解抗原根本不需要编码“基因”。显而易见的是，抗原可以是合成的或可以衍生自生物样品。作为非限制性实例，此类生物样品可以包括组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0139] “疾病”是动物的一种健康状态，其中动物不能维持体内平衡，并且如果疾病没有改善，则动物的健康继续恶化。

[0140] 相比之下，动物中的“病症”是一种健康状态，其中动物能够维持体内平衡，但其中动物的健康状态不如病症不存在时有利。如果不予以治疗，则病症不一定引起动物的健康状态的进一步下降。

[0141] 如本说明书中使用的，术语“恶性赘生物”被定义为特征在于异常细胞的快速和不受控制的生长的疾病。恶性细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到生物的其它部分。各种恶性赘生物的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、恶性脑赘生物、淋巴瘤、白血病、肺癌、骨髓瘤、多发性骨髓瘤等。

[0142] 可以治疗的恶性赘生物包括未血管化或尚未显著血管化的肿瘤以及血管化肿瘤。

[0143] 恶性赘生物可以包含非实体瘤(例如血液学肿瘤，例如白血病和淋巴瘤)或可以包含实体瘤。待用本发明的CAR治疗的恶性肿瘤类型包括但不限于癌、母细胞瘤和肉瘤，以及某些白血病或淋巴样恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤，以及恶性肿瘤例如肉瘤、癌和黑色素瘤。还包括成人肿瘤/癌症和儿科肿瘤/恶性赘生物。

[0144] 血液恶性肿瘤是血液或骨髓的恶性赘生物。血液学(或血源性)恶性赘生物的实例包括白血病，包括急性白血病(例如急性淋巴细胞白血病，急性髓性白血病，急性粒细胞性白血病，以及成髓细胞性、前髓细胞性、粒单核细胞性、单核细胞性和红白血病)、慢性白血病(例如慢性髓性(粒细胞)白血病、慢性粒细胞性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤(惰性和高级别形式)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和骨髓增生异常。

[0145] 实体瘤是异常的组织块，其通常不含囊肿或液体区域。实体瘤可以是良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成其的细胞类型命名(例如，肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤例如肉瘤和癌的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴样恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和CNS肿瘤(如神经胶质瘤(如脑干胶质瘤和混合性胶质瘤)、胶质母细胞瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤)、星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、髓母细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤(menangioma)、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移)。

[0146] 如本说明书中使用的，术语“内源的”指来自生物、细胞、组织或系统，或者在生物、细胞、组织或系统内部天然产生的任何材料。

[0147] 如本说明书中使用的，术语“外源的”指引入生物、细胞、组织或系统内，或者在生物、细胞、组织或系统外部产生的任何材料。

[0148] 如本说明书中使用的，术语“表达”被定义为由其启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0149] 术语“过表达的”肿瘤抗原或肿瘤抗原的“过表达”预期指示相对于来自该组织或器官的正常细胞中的表达水平，在来自患者的特定组织或器官内的疾病病灶如实体瘤的细胞中的肿瘤抗原的异常表达水平。可以通过本领域已知的标准测定来确定患有特征在于肿瘤抗原的过表达的实体瘤或血液学恶性肿瘤的患者。

[0150] 术语“患者”、“个体”等等在本文中可互换使用，并且指顺应本文所述方法的任何动物或其细胞，无论是体外的还是原位的。在某些非限制性实施方案中，患者或个体是人。

[0151] 如本说明书中使用的，术语“多核苷酸”被定义为核苷酸链。此外，核酸是核苷酸的聚合物。因此，如本说明书中使用的，术语核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有核酸是可以水解为单体“核苷酸”的多核苷酸的一般知识。单体核苷酸可以水解成核苷。如本说明书中使用的，作为非限制性实例，多核苷酸包括通过本领域可用的任何手段获得的所有核酸序列，作为非限制性实例，所述任何手段包括重组手段，即使用普通克隆技术和PCR等等从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列，以及通过合成手段。

[0152] 如本说明书中使用的，术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用，并且它们指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸，并且对可以构成蛋白质或肽的序列的氨基酸的最大数目没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本说明书中使用的，该术语指短链(其在本领域中通常也被称为例如肽、寡肽和寡聚物)以及更长的链(其在本领域中一般被称为蛋白质，其存在许多类型)两者。“多肽”尤其包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0153] 发明详述

嵌合抗原受体(CAR)的分离的替代细胞内信号传导结构域

CAR的细胞内信号传导结构域，或换言之，本发明的细胞质结构域负责激活CAR已置于其中的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。术语“效应子功能”指细胞的特殊功能。例如，T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性，包括细胞因子的分泌。因此，术语“细胞内信号传导结构域”指转导效应子功能信号并且促使细胞执行特殊功能的蛋白质部分。虽然通常可以采用整个细胞内信号传导结构域，但在许多情况下不必使用整条链。当使用细胞内信号传导结构域的截短部分时，可以使用此类截短部分代替完整链，只要它转导效应子功能信号。因此，术语“细胞内信号传导结构域”意欲包括足以转导效应子功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0154] 用于根据本发明的CAR中的细胞内信号传导结构域的优选实例包括共同作用以在抗原受体结合之后启动信号转导的T细胞受体(TCR)和共受体的细胞质序列，以及这些序列的任何衍生物或变体以及具有相同功能能力的任何合成序列。

[0155] 已知通过单独的TCR生成的信号不足以完全激活T细胞，并且还需要次级信号或共刺激信号。因此，可以说T细胞激活由两类细胞质信号传导序列介导：通过TCR启动抗原依赖

性初级激活的那些序列(初级细胞质信号传导序列),以及以抗原不依赖性方式起作用以提供次级信号或共刺激信号的那些序列(次级细胞质信号传导序列)。

[0156] 初级细胞质信号传导序列以刺激方式或抑制方式调控TCR复合物的初级激活。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列可能含有信号传导基序,其被称为免疫受体酪氨酸激活基序(基于免疫受体酪氨酸的激活基序)或ITAM。

[0157] 含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括衍生自TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD8、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。特别优选CAR中的细胞质信号传导分子含有衍生自CD3ζ的细胞质信号传导序列。

[0158] CAR的细胞质结构域可以被设计为包含单独或与在CAR的背景下有用的任何其它所需的细胞质结构域组合的CD3-ζ信号传导结构域。

[0159] CD3-ζ信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR。

[0160] 上述信号传导结构域含有3个ITAM (基于免疫受体酪氨酸的激活基序),特别是ITAM1、ITAM2和ITAM3。

[0161] ITAM1具有由APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR (SEQ ID NO: 1)表示的氨基酸序列。

[0162] ITAM2具有由PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM (SEQ ID NO: 2)表示的氨基酸序列。

[0163] ITAM3具有由ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ (SEQ ID NO: 3)表示的氨基酸序列。

[0164] 在一个方面,本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)的分离的替代细胞内信号传导结构域,其中选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个或两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

[0165] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

[0166] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM1由ITGB3取代。

[0167] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM2由ITGB3取代。

[0168] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM3由ITGB3取代。

[0169] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)由整联蛋白β3(ITGB3)的氨基酸序列的片段取代。

[0170] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM2和ITAM3由两个ITGB3取代。

[0171] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在

于,ITAM1和ITAM3由两个ITGB3取代。

[0172] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITAM1和ITAM2由两个ITGB3取代。

[0173] 在一个方面,本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)的分离的替代细胞内信号传导结构域,其包括选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个或两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的一个或两个片段,其中ITAM和ITGB3的总数为三。

[0174] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的两个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的一个片段。

[0175] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM2、ITAM3和ITGB3。

[0176] 在一些实施方案中,替代的细胞内信号传导结构域包括ITAM1、ITAM3和ITGB3。

[0177] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM1、ITAM2和ITGB3。

[0178] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括选自ITAM1、ITAM2和ITAM3的一个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),以及整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

[0179] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM1和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

[0180] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM2和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

[0181] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,它包括ITAM3和整联蛋白β3 (ITGB3)的氨基酸序列的两个片段。

[0182] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有由DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT SEQ ID NO: 4)表示的氨基酸序列、或者由含有任何1或2个保守取代的DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT SEQ ID NO: 4)表示的氨基酸序列。

[0183] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有由含有任何1个保守取代的DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)表示的氨基酸序列。

[0184] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有由含有任何2个保守取代的DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)表示的氨基酸序列。

[0185] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域的特征在于,ITGB3具有由DTANNPLYKEATSTFTNITYRGT (SEQ ID NO: 4)表示的氨基酸序列。

[0186] 保守氨基酸取代意指用结构相似的另一种氨基酸替换一个氨基酸。此类替换并不引起ITGB3的性质改变。

[0187] 保守取代在表A中的“优选取代”下显示。如果此类取代引起生物活性中的改变,则可以引入另外的显著修饰,其在表A中称为“示例性取代”。

表A		
原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
he(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0188] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 5),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 5的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 5的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0189] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 6),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 6的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 6的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0190] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 7),或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 7的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 7的不同之处仅在于非保

守的氨基酸残基。

[0191] 在一些实施方案中，嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 8)，或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 8的氨基酸序列具有至少95%同一性，并且与SEQ ID NO: 8的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0192] 在一些实施方案中，嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPR (SEQ ID NO: 9)，或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 9的氨基酸序列具有至少95%同一性，并且与SEQ ID NO: 9的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0193] 在一些实施方案中，嵌合抗原受体(CAR)的替代细胞内信号传导结构域具有氨基酸序列RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 10)，或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 10的氨基酸序列具有至少95%同一性，并且与SEQ ID NO: 10的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0194] 嵌合抗原受体(CAR)

在一个方面，本发明涉及分离的嵌合抗原受体(CAR)，其包含上文提到的替代细胞内信号传导结构域。

[0195] 在一些实施方案中，分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于，它包含：

a)对于肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域；

b)跨膜结构域；

c)共刺激结构域；

d)替代的细胞内信号传导结构域。

[0196] 本发明涉及包含细胞外结构域和细胞内结构域的嵌合抗原受体(CAR)。细胞外结构域包含靶特异性结合元件，也称为抗原结合结构域。细胞内结构域或也称为细胞质结构域，包含共刺激信号传导区域和ζ链部分。共刺激信号传导区域指包含共刺激分子的细胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子是除淋巴细胞对抗原的有效应答所需的抗原受体或其配体外的细胞表面分子。

[0197] 在CAR的细胞外结构域和跨膜结构域之间、或在CAR的细胞质结构域和跨膜结构域之间，可以掺入间隔区结构域。如本说明书中使用的，术语“间隔区结构域”通常意指发挥功能将跨膜结构域连接到多肽链中的细胞外结构域或细胞质结构域的任何寡肽或多肽。间隔区结构域可以包含至多300个氨基酸，优选10至100个氨基酸，且最优选25至50个氨基酸。

[0198] 在一个实施方案中，本发明的CAR包含含有抗原结合结构域的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域。

[0199] 在一个实施方案中，使用与CAR中的结构域之一天然结合的跨膜结构域。

[0200] 在另一个实施方案中，跨膜结构域可以加以选择或通过氨基酸取代进行修饰，以避免此类结构域与相同或不同膜表面蛋白的跨膜结构域的结合，以使与受体复合物的其它成员的相互作用降到最低。

[0201] 抗原结合结构域

如本说明书中使用的,术语抗体的“抗原结合结构域”或抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”(或简称为“抗体部分”或“抗体片段”),指保留与抗原特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。已显示了抗体的抗原结合功能可以由完全尺寸的抗体的片段来执行。由术语抗体的“抗原结合部分”包括的结合片段的实例包括:

(i) Fab片段,一种由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;

(ii) F(ab')2片段,一种包含通过在铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;

(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;

(iv)由抗体单臂中的VL和VH结构域组成的Fv片段,

(v) dAb片段(Ward等人,(1989) Nature 341:544-546),其由VH/VHH结构域组成;和

(vi)分离的互补决定区(CDR)。

[0202] 另外,Fv片段的两个区域VL和VH由不同的基因编码,它们可以使用重组方法使用合成接头进行连接,所述合成接头致使它们作为单条蛋白质链接受,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv (scFv);参见例如,Bird等人(1988) Science 242:423-426;以及Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。假定此类单链分子也包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且以与完整抗体相同的方式筛选片段。

[0203] 术语“可变的”指可变结构域的某些部分在抗体之间的序列方面极大不同的事实。V结构域介导抗原结合,并且决定特定抗体对于其特定抗原的特异性。然而,可变性跨越可变结构域的110个氨基酸跨度并非均匀分布的。相反,V区由称为构架区(FR)的15-30个氨基酸的不变片段组成,所述构架区被称为“高变区”或CDR的具有极端可变性的较短区域分开。天然重链和轻链的可变结构域各自包含由三个高变区连接的四个FR,所述FR主要采用β-折叠构型,所述高变区形成连接β-折叠结构,且在一些情况下形成β-折叠结构的部分的环。每条链中的高变区通过FR紧密结合在一起,并且与来自另一条链的高变区一起,促成抗体的抗原结合位点的形成。

[0204] 如本说明书中使用的,术语“高变区”指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区一般包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基和/或来自“高变环”的那些残基。

[0205] 在某些情况下,还可能期望改变一个或多个CDR氨基酸残基,以便改善对靶表位的结合亲和力。这被称为“亲和力成熟”并且可以任选地与人源化结合执行,例如在其中抗体的人源化导致结合特异性或亲和力降低,并且不能通过单独的回复突变充分改善结合特异性或亲和力的情形下。各种亲和力成熟方法是本领域已知的,例如Burks等人,Proc Natl Acad Sci USA,94:412-417 (1997)描述的体外扫描饱和诱变方法,以及Wu等人,Proc Natl Acad Sci USA 95:6037 6042 (1998)的逐步体外亲和力成熟方法。

[0206] “结合”靶抗原的根据本发明的抗体的抗原结合结构域指这样的抗体的抗原结合结构域,其以足够的亲和力结合抗原,使得抗体的抗原结合结构域可以在靶向表达抗原的蛋白质或细胞或组织中用作诊断剂和/或治疗剂,并且与其它蛋白质轻微交叉反应。如通过以下分析方法确定的:荧光激活细胞分选(FACS)、放射免疫沉淀测定(RIA)或ELISA,抗体的

抗原结合结构域与“非靶”蛋白的结合程度为抗体的抗原结合结构域与特定靶蛋白的结合的小于约10%。关于抗体的抗原结合结构域与靶分子的结合，术语“特异性结合”或者短语与特定多肽或特定多肽靶上的表位“特异性结合”或对于其“特异性”，意指与非特异性相互作用明显(可测量地)不同的结合。

[0207] 在一个实施方案中，本发明的CAR包含靶特异性结合元件，也称为抗原结合结构域。结构域的选择取决于限定靶细胞表面的配体的类型和数目。例如，可以选择抗原结合结构域，以识别与特定疾病状态相关的在靶细胞上充当细胞表面标记物的配体。因此，细胞表面标记物(其可以充当本发明的CAR中的抗原结合结构域的结构域的配体)的实例包括与恶性细胞相关的那些细胞表面标记物。

[0208] 在一个实施方案中，可以通过改造与肿瘤细胞上的抗原特异性结合的所需抗原结合结构域，将本发明的CAR改造为靶向目的肿瘤抗原。在本发明的上下文中，“肿瘤抗原”或“过度增殖性病症抗原”或“与过度增殖性病症相关的抗原”，指特定过度增殖性病症如恶性赘生物所共有的抗原。本说明书中讨论的抗原仅作为示例包括。该列表并不预期是排他性的，并且进一步的实例对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0209] 肿瘤抗原是由肿瘤细胞产生的蛋白质，其引发免疫应答，特别是T细胞介导的免疫应答。本发明的抗原结合结构域的选择将取决于待治疗的恶性赘生物的具体类型。肿瘤抗原是本领域众所周知的，并且包括例如神经胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(CEA)、β-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2 (AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostein、PSMA、Her2/neu、存活素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、ephrin B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF受体和间皮素。

[0210] 在一个实施方案中，肿瘤抗原包含与恶性肿瘤相关的一种或多种抗原性肿瘤表位。恶性肿瘤表达多种蛋白质，其可以充当免疫应答的靶抗原。这些分子包括但不限于组织特异性抗原，例如黑色素瘤中的MART-1、酪氨酸酶和GP100，以及前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶(PAP)和前列腺特异性抗原(PSA)。其它靶分子属于转化相关分子组，例如癌基因HER-2/Neu/ErbB-2。另一组靶抗原是癌胚抗原，例如癌胚抗原(CEA)。在B细胞淋巴瘤中，肿瘤特异性独特型免疫球蛋白构成了个别肿瘤独有的真正地肿瘤特异性免疫球蛋白抗原。B细胞分化抗原如CD19、CD20和CD37是B细胞淋巴瘤中的靶抗原的其它候选物。这些抗原中的一些(CEA、HER-2、CD19、CD20、独特型)已用作使用单克隆抗体的被动免疫疗法的靶，具有有限的成功。

[0211] 本发明中所述的肿瘤抗原类型也可以是肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。TSA是肿瘤细胞独有的，并不出现在生物中的其它细胞上。TAA抗原并非肿瘤细胞独有的，并且在阻止诱导对抗原的免疫耐受状态的条件下也在正常细胞上表达。肿瘤中的抗原表达可在致使免疫系统响应抗原的条件下发生。TAA可以是在胎儿发育过程中，当免疫系统不成熟且不能响应时在正常细胞上表达的抗原，或者它们可以是通常在正常细胞上以极低水平存在，但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达的抗原。

[0212] TSA或TAA抗原的非限制性实例包括下述：分化抗原，如MART-1/MelanA (MART-1)、gp100 (Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2和肿瘤特异性多谱系抗原，如MAGE-1、MAGE-3、

BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原,如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,如p53、Ras、HER-2/neu;起因于染色体易位的独特肿瘤抗原;如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;以及病毒抗原,如EB病毒抗原EBVA以及人乳头状瘤病毒(HPV)抗原E6和E7。其它基于蛋白质的大抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、β-连环蛋白、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、β-HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3/CA 27.29/BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68/P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733/EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90/Mac-2结合蛋白/亲环素C相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0213] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,抗原结合结构域对于选自以下的肿瘤抗原是特异性的:CD19、CD20、CD123或BCMA。

[0214] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,抗原结合结构域对于CD19肿瘤抗原是特异性的。

[0215] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,对于肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域是Fab或scFv。

[0216] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,对于肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域是scFv。

[0217] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,对于CD19肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域具有由DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 11)表示的氨基酸序列,或具有的氨基酸序列与SEQ ID NO: 11的氨基酸序列具有至少95%同一性,并且与SEQ ID NO: 11的不同之处仅在于非保守的氨基酸残基。

[0218] 具有SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的抗原结合结构域由以下组成:

a)具有氨基酸序列DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT的轻链可变结构域;

b)具有氨基酸序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG的接头。

[0219] c)具有氨基酸序列EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS的重链可变结构域。

[0220] 共刺激结构域

共刺激结构域或共刺激信号传导区域指包含共刺激分子的细胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子是除淋巴细胞对抗原的有效应答所需的抗原受体或其配体外的细胞表面分子。此类分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、ICAM-1、CDS、CD40、PD-1、ICOS (CD278)、淋巴细胞功能相关抗原1 (LFA-1、CD11a/CD18)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3以及与CD83特异性结合的配体等等。

[0221] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,共刺激结构域是选自以下的蛋白质的功能性信号传导结构域:OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1

(CD11a/CD18)、ICOS (CD278)和4-1BB (CD137)。

[0222] CAR的细胞质信号传导部分内的细胞质信号传导序列可以以随机或指定次序彼此连接。任选地,长度优选为2至10个氨基酸的短的寡肽或多肽接头可以形成连接。特别地,甘氨酸-丝氨酸双联体是合适的接头。

[0223] 在一个实施方案中,CAR的细胞质结构域被改造为包含上文提到的替代细胞内信号传导结构域和CD28的共刺激信号传导结构域。

[0224] 在另一个实施方案中,CAR的细胞质结构域被改造为包含上文提到的替代细胞内信号传导结构域和4-1BB的共刺激信号传导结构域。

[0225] 在又一个实施方案中,细胞质结构域被改造为包含上文提到的替代细胞内信号传导结构域以及CD28和4-1BB的共刺激结构域。

[0226] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,CD28的共刺激结构域具有由AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 13)表示的氨基酸序列。

[0227] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,4-1BB的共刺激结构域具有由KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 14)表示的氨基酸序列。

[0228] 跨膜结构域

关于跨膜结构域,CAR可以被改造为包含与CAR的细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用与CAR中的结构域之一天然缔合的跨膜结构域。在一些情况下,跨膜结构域可以加以选择或通过氨基酸取代进行修饰,以避免此类结构域与相同或不同膜表面蛋白的跨膜结构域的结合,以使与受体复合物的其它成员的相互作用降到最低。

[0229] 跨膜结构域可以衍生自天然来源或合成来源。当来源是天然的时,结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。用于本发明中的特定用途的跨膜区可以衍生自(即产生为至少包含其跨膜区) T细胞受体的α、β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154。可替代地,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,它将占优势地包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成跨膜结构域的每一端处发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0230] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,跨膜结构域是选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体-α、-β或-ζ链,CD28,CD3 ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。

[0231] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,跨膜结构域是CD8。

[0232] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,CD8的跨膜结构域具有氨基酸序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 12)。

[0233] 任选地,长度优选为2至10个氨基酸的短的寡肽或多肽接头可以形成CAR的跨膜结构域和细胞质信号传导结构域之间的连接。特别地,甘氨酸-丝氨酸双联体提供了合适的接头。

[0234] 在一些情况下,根据本发明的CAR的跨膜结构域包含CD8的铰链结构域。在一个实

施方案中,CD8的铰链结构域具有氨基酸序列TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 35)。

[0235] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)的特征在于,它进一步包含前导序列。

[0236] 在一些实施方案中,分离的嵌合抗原受体(CAR)具有由选自以下的氨基酸序列表示的氨基酸序列:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26,或者具有与选自以下的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26,并且与选自以下的氨基酸序列不同之处仅在于非保守的氨基酸残基:SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26。

[0237] 嵌合抗原受体19CAR-T-CD28-altcd3ζ (ITGB3- ITAM2- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 15)。

[0238] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITAM1- ITGB3- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 16)。

[0239] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITAM1- ITAM2- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK

GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 17)。

[0240] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITGB3- ITGB3- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKDTANNP
LYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 18)。

[0241] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITAM1- ITGB3- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
DTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 19)。

[0242] 嵌合抗原受体19CAR-T- CD28 - altcd3ζ (ITGB3- ITAM2- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 20)。

[0243] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITGB3- ITAM2- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 21)。

[0244] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITAM1- ITGB3- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 22)。

[0245] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITAM1- ITAM2- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 23)。

[0246] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITGB3- ITGB3- ITAM3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 24)。

[0247] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITAM1- ITGB3- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTKGDTA
NNPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 25)。

[0248] 嵌合抗原受体19CAR-T- 41bb - altcd3ζ (ITGB3- ITAM2- ITGB3)具有氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK
LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV

HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADDTANNPLYKEATSTFTNITYRGTRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGDTAN
NPLYKEATSTFTNITYRGTALPPRGSAAA (SEQ ID NO: 26)。

[0249] 核酸分子

在本说明书中可互换使用的术语“核酸”、“核序列”、“核酸序列”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”意指精确的核苷酸序列,修饰的或未修饰的,确定核酸的片段或区域,含有或不含非天然核苷酸,并且是双链DNA或RNA、单链DNA或RNA,或所述DNA的转录产物。

[0250] 此处还应该包括的是,本发明并不涉及处于其天然染色体环境中,即处于天然状态的核苷酸序列。本发明的序列已被分离和/或纯化,即它们例如通过拷贝直接或间接取样,它们的环境已至少部分地进行修饰。因此,此处还应该提到的是通过重组遗传学例如借助于宿主细胞、或通过化学合成获得的分离的核酸。

[0251] “分离的”核酸分子是被鉴定并且与至少一种核酸分子杂质分开的核酸分子,前者通常在蛋白质(多肽)的核酸的天然来源中与之结合。分离的核酸分子不同于其中它在天然条件下发现的形式或集合。因此,分离的核酸分子不同于在天然条件下存在于细胞中的核酸分子。然而,分离的核酸分子包括位于其中正常表达蛋白质(多肽)的细胞中的核酸分子,例如,如果核酸分子具有的染色体定位不同于其在天然条件下在细胞中的定位。

[0252] 除非另有说明,否则术语核苷酸序列包括其互补体。因此,具有特定序列的核酸应该被理解为包括具有其互补序列的其互补链的核酸。

[0253] 在本发明的上下文中,对于常见的核酸碱基使用下述缩写。“A”代表腺嘌呤,“C”代表胞嘧啶,“G”代表鸟嘌呤,“T”代表胸腺嘧啶(5-甲基尿嘧啶),它不存在于RNA中,它代替尿嘧啶存在于DNA中,并且“U”代表尿嘧啶(它代替胸腺嘧啶存在于RNA中)。

[0254] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括其为彼此的简并形式并编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可以包括内含子,其程度至编码蛋白质的核苷酸序列在一些形式中可含有内含子。

[0255] “编码”指多核苷酸(例如基因、cDNA或mRNA)中的特定核苷酸序列的固有性质,以充当生物过程中用于合成其它聚合物和大分子的模板,所述聚合物和大分子或者具有限定的核苷酸序列(即rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列;以及起因于其的生物学性质。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译导致在细胞或其它生物系统中的蛋白质产生,则该基因编码蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列等同并且通常在序列表中提供)和非编码链(其用作基因或cDNA转录的模板)两者,均可以被称为编码蛋白质或者该基因或cDNA的其它产物。

[0256] 可以使用本领域已知的重组方法获得编码所需分子的核酸序列,所述重组方法例如使用标准技术,通过筛选来自表达基因的细胞的文库、通过从已知包括其的载体中衍生出基因、或通过直接从含有其的细胞和组织中分离。可替代地,目的基因更通常地可以合成产生,而不是克隆。

[0257] 在一个方面,本发明涉及分离的核酸,其编码上文提到的替代细胞内信号传导结构域。

[0258] 在一个方面,本发明涉及分离的核酸,其编码上文提到的分离的嵌合抗原受体

(CAR),所述CAR包含上文提到的替代细胞内信号传导结构域。

[0259] 载体

如本文使用的,术语“载体”意指能够转运它已与之连接的另一种核酸的核酸分子。在一些实施方案中,载体是质粒,即环状双链DNA分子,另外的DNA区段可以借助于酶促连接反应掺入其内。在一些实施方案中,载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以借助于酶促连接反应掺入病毒基因组内。在一些实施方案中,载体能够在它们引入其内的遗传修饰细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起始位点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。在进一步的实施方案中,载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞内之后整合到宿主细胞的基因组内,并且从而连同宿主基因一起复制。此外,某些载体能够指导它们与之可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。

[0260] 如本说明书中使用的,术语“表达控制序列”指实现它们借助于酶促连接反应掺入其内的编码序列的表达和加工所需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号,如剪接和多聚腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及在需要时,增强蛋白质分泌的序列。此类控制序列的性质取决于宿主生物而不同。真核细胞包括启动子、多聚腺苷酸化信号和增强子。术语“控制序列”预期至少包括其存在对于表达和加工是必要的所有组分,并且还可以包括其存在是有利的另外组分,例如前导序列和融合配偶体序列。

[0261] 当核酸置于与另一种核酸序列的功能关系内时,它是“可操作地连接的”。例如,如果前序列或分泌前导序列的DNA表达为参与多肽分泌的前蛋白,则它与多肽的DNA是可操作地连接的;如果启动子或增强子影响序列的转录,则它与编码序列是可操作地连接的;如果核糖体结合位点的定位使得促进翻译,则它与编码序列是可操作地连接的。通常,“可操作地连接的”意指被连接的DNA序列是邻接的,并且在分泌前导区的情况下,是邻接且在读码框中的。然而,增强子不必是邻接的。

[0262] “递送载体(delivery vector)”或“递送载体(delivery vectors)”意指任何递送载体,其可以用于本发明中以置于细胞接触(即“接触”)、或者将本发明中所需的试剂/化学品和分子(蛋白质或核酸)递送到细胞或亚细胞区室内部(即“引入”)。它包括但不限于脂质体递送载体、病毒递送载体、药物递送载体、化学载体、聚合物载体、脂质复合物(lipoplexes)、聚合复合物(polyplexes)、树枝状聚合物、微泡(超声造影剂)、纳米颗粒、乳状液或其它适当的转移载体。这些递送载体允许递送分子、化学品、大分子(基因、蛋白质)或其它载体例如质粒、肽。在这些情况下,递送载体是分子载体。“递送载体(delivery vector)”或“递送载体(delivery vectors)”还意指执行转染的递送方法。

[0263] “表达载体”指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含用于表达的适当的顺式作用元件;用于表达的其它元件可以由遗传修饰细胞的元件或在体外表达系统中供应。表达载体包括本领域已知的所有那些表达载体,例如掺入有重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸的或包含在脂质体中的)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0264] 简言之,通常通过将编码CAR多肽或其一部分的核酸与启动子可操作地连接,并且

将构建体引入表达载体内，来实现编码CAR的天然或合成核酸的表达。载体可以适合于复制和整合到真核细胞内。通常的克隆载体含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调控所需核酸序列的表达的启动子。

[0265] 如本说明书中使用的，术语“启动子”定义为启动多核苷酸序列的特异性转录所需的、由细胞的合成机制或所引入的合成机制识别的DNA序列。

[0266] 如本说明书中使用的，术语“启动子/调控序列”意指与启动子/调控序列可操作地连接的基因产物的表达所需的核酸序列。在一些情况下，这种序列可以是核心启动子序列，而在其它情况下，这种序列还可以包括增强子序列和基因产物的表达所需的其它调控元件。例如，启动子/调控序列可以是以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调控序列。

[0267] “组成型”启动子是这样的核苷酸序列，当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时，在细胞的大部分或所有生理条件下，所述核苷酸序列促使基因产物在细胞中产生。

[0268] “诱导型”启动子是这样的核苷酸序列，当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时，基本上仅当对应于启动子的诱导物存在于细胞中时，所述核苷酸序列促使基因产物在细胞中产生。

[0269] “组织特异性”启动子是这样的核苷酸序列，当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时，基本上仅当细胞是对应于启动子的组织类型的细胞时，所述核苷酸序列促使基因产物在细胞中产生。

[0270] 合适启动子的一个实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是强组成型启动子序列，其能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达。合适启动子的另一个实例是延伸因子1α (EF-1a)启动子。然而，也可以使用其它组成型启动子序列，包括但不限于猿猴病毒40 (SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、EB病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子，以及人基因启动子例如但不限于肌动蛋白基因启动子、肌球蛋白基因启动子、血红蛋白基因启动子和肌酸激酶基因启动子。进一步地，本发明不应限于组成型启动子的使用。诱导型启动子也被考虑作为本发明的部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关，当需要此类表达时能够开启它与之可操作地连接的多核苷酸序列的表达，或者在不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白(metallothionine)启动子、糖皮质激素基因启动子、孕酮基因启动子和四环素基因启动子。

[0271] 另外的启动子元件例如增强子调控转录起始的频率。通常，它们位于起始位点上游30-110 bp的区域中，尽管最近已显示许多启动子含有起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间距经常是灵活的，使得当元件倒置或相对于彼此移动时，启动子功能被阻止。在胸苷激酶(tk)启动子中，启动子元件之间的间距可以在活性开始下降之前增加到50 bp。取决于启动子，看起来个别元件可以协同地或独立地发挥功能，以激活转录。

[0272] 本发明涉及包含CAR序列的DNA构建体，其中所述序列包含与细胞内结构域的核酸序列可操作地连接的抗原结合结构域的核酸序列。可以用于根据本发明的CAR中的细胞内结构域的实例包括但不限于上文提到的替代细胞内信号传导结构域、CD28和/或4-1BB的共刺激结构域等；在一些情况下，CAR可以包含上文提到的替代细胞内信号传导结构域、CD28

的共刺激结构域、4-1BB的共刺激结构域等的任何组合。

[0273] 在一个实施方案中，根据本发明的CAR包含抗CD19 scFv、人CD8的铰链和跨膜结构域和4-1BB的共刺激结构域、以及上文提到的替代细胞内信号传导结构域。

[0274] 在一个实施方案中，根据本发明的CAR包含抗CD19 scFv、人CD8的铰链和跨膜结构域和CD28的共刺激结构域、以及上文提到的替代细胞内信号传导结构域。

[0275] 本发明的表达构建体还可以用于使用标准基因递送技术的核酸免疫和基因疗法。用于基因递送的方法是本领域已知的。参见例如，整体引入本文作为参考的美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466。在另一个实施方案中，本发明涉及基因疗法载体。

[0276] 核酸可以克隆到多种类型的载体内。例如，核酸可以克隆到包括但不限于以下的载体内：质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别有利的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0277] 此外，表达载体可以以病毒载体的形式递送至细胞。病毒载体技术是本领域众所周知的，并且例如在Sambrook等人(2001，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory，New York)，以及其它病毒学和分子生物学手册中进行描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般而言，合适的载体含有在至少一种生物中有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性内切核酸酶位点和一种或多种可选择标记物(例如，WO 01/96584；WO 01/29058；和美国专利号6,326,193)。

[0278] 已开发了许多基于病毒的系统用于将基因转移到哺乳动物细胞内。例如，逆转录病毒提供了用于基因递送系统的合适平台。可以使用本领域已知的技术，将所选的基因插入载体内并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒，并且在体内或离体递送至受试者的细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中，使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一个实施方案中，使用慢病毒载体。

[0279] 本发明还提供了其中插入本发明的DNA的载体。衍生自逆转录病毒如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具，因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体具有超过衍生自癌逆转录病毒(例如鼠白血病病毒)的载体的附加优点，因为它们可以转导非增殖性细胞，例如肝细胞。它们还具有低免疫原性的附加优点。

[0280] 如本文使用的，“慢病毒”指逆转录病毒科(Retroviridae)的一个属。慢病毒在逆转录病毒中在能够感染非分裂细胞方面是独特的；它们可以在宿主细胞中递送显著量的遗传信息如DNA，因此它们是用于实现基因递送载体的最有效方法之一。HIV、SIV和FIV是慢病毒的实例。衍生自慢病毒的载体提供了在体内实现显著水平的基因转移的手段。

[0281] 为了评价CAR多肽或其一部分的表达，待引入细胞内的表达载体还可以含有可选择标记物基因或报告基因或两者，以促进从待使用病毒载体进行转染或感染的细胞群体中鉴定和选择表达细胞。在其它方面，可选择标记物可以携带分开的DNA片段并用于共转染技术中。可选择标记物和报告基因两者均可以由适当的调控序列侧接，以致使在宿主细胞中的表达。有用的可选择标记物包括例如抗生素抗性基因，例如neo等等。

[0282] 报告基因用于鉴定潜在地转染的细胞和评估调控序列的功能性。一般而言，报告基因是生物或组织中不存在或不表达并且编码多肽的基因，所述多肽的表达通过一些易于检测的性质例如酶促活性来表现。在已将DNA引入受体细胞内之后，在合适的时间测定报告

基因的表达。合适的报告基因可以包括编码萤光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌性碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白的基因 (例如,Ui-Tei等人,2000 FEBS Letters 479: 79-82)。合适的表达系统是众所周知的,并且可以使用已知技术制备或商业获得。一般而言,显示报告基因的最高表达水平的具有最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。此类启动子区可以与报告基因连接,并且用于评估试剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0283] 本发明涉及包含核酸分子的载体,所述核酸分子编码根据本发明的上文提到的嵌合抗原受体(CAR)。

[0284] 在一个方面,本发明涉及包含上文提到的核酸的表达载体,所述核酸编码根据本发明的上文提到的嵌合抗原受体(CAR)。

[0285] 在一个方面,本发明涉及包含上文提到的核酸的递送载体,所述核酸编码根据本发明的上文提到的嵌合抗原受体(CAR)。

[0286] 在一些实施方案中,载体选自DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

[0287] 在一些实施方案中,载体进一步包含启动子。

[0288] 在一些实施方案中,载体是体外转录的载体。

[0289] 在一些实施方案中,核酸序列进一步包含聚(A)序列。

[0290] 在一些实施方案中,核酸序列进一步包含3'UTR。

[0291] 宿主细胞及其生产方法

如本文使用的,术语"遗传修饰细胞"(或"重组宿主细胞")指重组表达载体已引入其内的细胞。本发明涉及"遗传修饰细胞",其可以包括例如根据本发明的上述载体。应当理解,"遗传修饰细胞"和"重组宿主细胞"不仅指特定请求保护的细胞,还指此类细胞的后代。由于突变或环境影响可能在后续代中发生修饰,因此此类后代实际上可能与亲本细胞不相同;然而,此类细胞仍包括在如本文使用的术语"遗传修饰细胞"的范围内。

[0292] 在一个方面,本发明涉及用于产生包含上述嵌合抗原受体(CAR)的"遗传修饰细胞"的方法,其包括通过上述方法转化细胞。

[0293] 用于在细胞中掺入和表达基因的方法是本领域已知的。在表达载体的背景下,载体可以通过本领域已知的任何方法容易地插入宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞内。例如,可以通过物理、化学或生物方法将表达载体转染到宿主细胞内。

[0294] 用于将多核苷酸引入宿主细胞内的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等等。用于生产包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见例如,Sambrook等人(2001,Molecular Cloning: A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。用于将多核苷酸引入宿主细胞内的优选方法是使用磷酸钙的转染。

[0295] 用于将目的多核苷酸引入宿主细胞内的生物学方法包括DNA和RNA载体的使用。病毒载体,且尤其是逆转录病毒载体,已成为用于将基因插入哺乳动物细胞(例如人细胞)内的最广泛使用的方法。其它病毒载体可以衍生自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒1、腺病毒和腺相关病毒等等。参见例如,美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0296] 用于将多核苷酸引入宿主细胞内的化学手段包括胶体分散系统,例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳状液、胶束、混合胶束和脂质体。用

作体外和体内递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊泡)。

[0297] 在其中利用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介物是脂质体。考虑使用脂质制剂用于将核酸引入宿主细胞内(在体外、离体或在体内)。在另一个方面,核酸可以与脂质连接。与脂质连接的核酸可以被包封在脂质体的水性内部,散布在脂质体的脂质双层内,经由连接到脂质体和寡核苷酸两者的连接分子附着至脂质体,包埋在脂质体中,与脂质体复合,分散在含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合;它可以作为悬浮液包含在脂质中,与胶束一起包含或复合,或以其它方式连接到脂质。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物并不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可以以双层结构、作为胶束或“塌陷”结构存在。它们也可以简单地散布在溶液中,可能形成在大小或形状方面不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质,其可以是天然存在的或合成的脂质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪小滴,以及含有长链脂肪族烃及其衍生物的化合物类别,例如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛。

[0298] 适用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从Sigma,St. Louis,MO购买;二鲸蜡醇磷酸酯(“DCP”)可以从K & K Laboratories(Plainview,N.Y.)购买;胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring购买;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可以从Avanti Polar Lipids,Inc. (Birmingham,AL)购买。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可以贮存于约-20°C下。氯仿用作唯一的溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语,其包括通过生成封闭的脂质双层或聚集体而形成的各种单层和多层脂质媒介物。脂质体可以表征为具有囊泡结构,其具有磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有被水性介质分开的多个脂质层。当磷脂悬浮于过量的水溶液中时,它们自发地形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自我重排,并且在脂质双层之间截留水和溶解的溶质(Ghosh等人,191 Glycobiology 5;505-10)。然而,还包括在溶液中具有与正常囊状结构不同的结构的组合物。例如,脂质可能采取胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还包括的是lipofectamine-核酸复合物。

[0299] 无论用于将外源核酸引入宿主细胞内或以其它方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法如何,为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在,可以执行各种测定。此类测定包括例如本领域技术人员众所周知的“分子生物学”测定,例如DNA和RNA印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,例如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹)或通过本说明书中描述的测定,以鉴定落入本发明的范围内的试剂。

[0300] 在一个方面,本发明涉及包含上述嵌合抗原受体(CAR)的遗传修饰细胞,其通过上述方法产生。

[0301] 根据本发明的一个实施方案进一步提供了包含本文所述的任何重组表达载体的遗传修饰细胞。如本文使用的,术语“遗传修饰细胞”指可以含有根据本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。遗传修饰细胞可以是真核细胞,例如植物、动物、真菌或藻类细胞,或者可以是原核细胞,例如细菌或原生动物细胞。遗传修饰细胞可以是培养细胞或原代细胞,即直接从生物例如人中分离的细胞。遗传修饰细胞可以是贴壁细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。合适的宿主细胞是本领域已知的,并且包括例如DH5α大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等等。为了扩增或复制重组表达载体,宿主细胞优选为原核细胞,例如DH5α细胞。为了产生重组CAR,遗传修饰细胞可以是哺乳动物细胞。遗

传修饰细胞可以是人细胞。虽然遗传修饰细胞可以是任何细胞类型，可以源自任何类型的组织，并且可以处于任何发育阶段，但遗传修饰细胞可以是外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。遗传修饰细胞可以是T细胞。遗传修饰细胞可以是NK细胞。

[0302] 为了本发明的目的，T细胞可以是任何T细胞，例如培养的T细胞，例如原代T细胞，或来自培养的T细胞系例如Jurkat、SupT1等的T细胞，或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得，则T细胞可以从众多来源获得，所述来源包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或者其它组织或体液。T细胞也可以是富集或纯化的。T细胞可以是人T细胞。T细胞可以是从人生物中分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞，并且可以是任何发育阶段，包括但不限于$CD4^+/CD8^+$双阳性T细胞、$CD4^+$辅助T细胞例如Th_1和Th_2细胞、$CD8^+$ T细胞(例如，细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、幼稚T细胞等等。T细胞可以是$CD8^+$ T细胞或$CD4^+$ T细胞。

[0303] T细胞可以得自多种来源，包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本发明的某些实施方案中，可以使用本领域可用的任何数目的T细胞系。在本发明的某些实施方案中，T细胞可以得自使用技术人员已知的任何技术，例如Ficoll分离，从受试者中收集的血液单位。在一个优选实施方案中，来自个体的循环血液的细胞通过单采血液成分术获得。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞，包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白血细胞、红血细胞和血小板。在一个实施方案中，可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞，以去除血浆级分并且将细胞置于适当的缓冲液或培养基中，用于后续加工步骤。在本发明的一个实施方案中，细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行洗涤。在一个替代实施方案中，洗涤溶液缺乏钙，并且可能缺乏镁或者可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。此外，令人惊讶的是，在不存在钙的情况下的初始激活步骤导致放大的激活。如本领域技术人员将了解的，洗涤步骤可以通过本领域已知的方法完成，例如通过根据制造商的说明书使用半自动化“流通”离心机(例如，细胞处理器Cobe 2991、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)。在洗涤后，细胞可重悬浮于各种生物相容的缓冲液中，例如不含Ca2+不含Mg2+的PBS、Plasmalyte A或者含或不含缓冲剂的其它盐水溶液。可替代地，可以去除单采血液成分术样品的不期望的组分，并且可以将细胞直接重悬浮于培养基中。

[0304] 在一些实施方案中，遗传修饰细胞是T淋巴细胞。

[0305] 在一些实施方案中，遗传修饰细胞是CD8+ T细胞。

[0306] 在一些实施方案中，遗传修饰细胞是NK细胞。

[0307] 在一些实施方案中，遗传修饰细胞用作药用剂。

[0308] 在一些实施方案中，遗传修饰细胞用作用于肿瘤疾病的药用剂。

[0309] 在一些实施方案中，遗传修饰细胞用作用于其中肿瘤是癌症的疾病的药用剂。

实施例

[0310] 提供下述实施例用于本发明的更好理解。这些实施例仅用于说明的目的，并且不应被解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0311] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请都引入本文作为参考。尽管为了清楚理解的目的，上述发明已通过说明和示例的方式相当详细地进行描述，但根据本发明

的教导,对于本领域的普通技术人员显而易见的是,可以对其进行某些改变和修改,而不脱离所附实施方案的精神或范围。

[0312] 材料和一般方法

重组DNA技术

DNA操作通过如Sambrook J.等人,Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989描述的标准技术来进行。分子生物学试剂根据制造商的说明书使用。

[0313] 基因合成

从通过化学合成制备的寡核苷酸制备所需的基因区段。通过寡核苷酸的退火和连接包括PCR扩增,组装长300-4000 kb的侧翼为单一限制性位点的基因区段,随后经由所指示的限制性位点进行克隆。亚克隆的基因片段的DNA序列通过DNA测序加以确认。

[0314] 包含如下所述的所述抗体链的融合基因通过PCR和/或基因合成生成,并且通过例如使用相应载体中的独特限制性位点来连接相应的核酸区段,用已知的重组方法和技术进行组装。通过DNA测序验证亚克隆的核酸序列。对于瞬时转染,通过自转化的大肠杆菌培养物的质粒制备来制备更大数量的质粒。

[0315] DNA序列确定

DNA序列通过桑格测序进行确定。

[0316] DNA和蛋白质序列分析和序列数据管理

Infomax的Vector NTI Advance套件版本8.0和SnapGene Viewer用于序列创建、映射、分析、注释和说明。

[0317] 用于制备具有4-1BB的共刺激结构域的载体的克隆方案

三个ITGB3重复的片段由合成寡核苷酸(各59 bp的10个小片)进行组装;在两轮扩增后制备308 bp的扩增子。接下来,我们通过剪接PCR (SOE,重叠延伸剪接(Splicing by overlap extension))扩增了预定数目的ITGB3片段(1、2或3个,取决于特定载体的结构特征)与之连接的scFv的恒定部分(前导区-SVL-GS-接头-SVH-4-1BB CD3)。使用XbaI/NotI位点,将所得到的产物克隆到预线性化的载体pCDH-eGFP内。通过对盒的整个序列进行测序来验证所得到的构建体。

[0318] 用于制备具有CD28的共刺激结构域的载体的克隆方案

三个ITGB3重复的片段由合成寡核苷酸(各59 bp的10个小片)进行组装;在两轮扩增后制备308 bp的扩增子。接下来,我们通过剪接PCR (SOE,重叠延伸剪接)扩增了预定数目的ITGB3片段(1、2或3个,取决于特定载体的结构特征)与之连接的scFv的恒定部分(前导区-SVL-GS-接头-SVH-CD28-CD3)。使用XbaI/NotI位点,将所得到的产物克隆到预线性化的载体pCDH-eGFP内。通过对盒的整个序列进行测序来验证所得到的构建体。

[0319] 实施例1

制备合成ITGB3基因的序列。

[0320] 为了制备ITGB3的三个重复片段的块,使用各60 bp的合成寡核苷酸,所述寡核苷酸形成在嵌合结构CD8 4-1BB altCD3ζ或CD8 CD28 altCD3ζ内的基因区域的完全重叠序列。该基因通过两轮PCR进行组装。

[0321] 实施例2

密码子优化的ITGB3片段的序列。

[0322] 编码ITGB3的核苷酸序列的3种不同变体用于在19CAR-T盒中排列ITGB3片段，并且防止基因中可能的重组。此类序列的变体在下文给出。

[0323] 变体1

gatactgccaacaacccactttacaaagaagctacatccaccttcaccaatataacctacagaggtact

D T A N N P L Y K E A T S T F T N I T Y R G T

变体2

gacaccgctaacaatcctctgtataaagaggcaaccagcacttttacaaacattacttataggggaacc

D T A N N P L Y K E A T S T F T N I T Y R G T

变体3

gatacagcaaataacccccttgtacaaggaagccacttctacattcactaatatcacctatcgcggcaca

D T A N N P L Y K E A T S T F T N I T Y R G T

实施例3

克隆盒19CAR-T-ITGB3和19CAR-T-CD28-ITGB3的各种序列变体。

[0324] 为了克隆盒19CAR-T-ITGB3-ITGB3-ITGB3 (图4)，通过使用载体pCDH-CAR-T-EGFP作为模板的方式，通过PCR扩增来生成基因的恒定区，其中特定寡核苷酸引物的参与限制了盒19CAR-T的恒定部分。19CAR-T基因的区域和三个ITGB3片段的块通过剪接PCR (SOE，重叠延伸剪接)进行融合。

[0325] 为了克隆盒19CAR-T-ITGB3-ITGB3 (图2)，使用验证的pCDH-19CAR-T-ITGB3-ITGB3-ITGB3作为模板，通过PCR扩增类似地制备基因的区域，其受特异性引物限制并包括ITGB3-ITGB3重复。

[0326] 为了克隆盒19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITGB3 (图6)，通过使用载体pCDH-CAR-T-EGFP作为模板的方式，通过PCR扩增来生成基因的恒定区，其中特定寡核苷酸引物的参与限制了19CAR-T-ITAM1的恒定部分。基因区域通过剪接PCR与ITGB3-ITGB3块进行融合。

[0327] 为了克隆盒19CAR-T-ITAM1-ITAM2-ITGB3 (图8)，通过使用载体pCDH-CAR-T-EGFP作为模板的方式，通过PCR扩增来生成基因的恒定区，其中特定寡核苷酸引物的参与限制了19CAR-T-ITAM1-ITAM2的恒定部分。基因区域通过剪接PCR与ITGB3块进行融合。

[0328] 为了克隆盒19CAR-T-ITGB3-ITAM2-ITGB3 (图14)，通过使用载体pCDH-CAR-T-EGFP作为模板的方式，通过PCR扩增来生成基因的恒定区，其中特定寡核苷酸引物的参与限制了19CAR-T的恒定部分。基因区域通过剪接PCR与两个ITGB3和ITAM2的块进行融合。

[0329] 为了克隆盒19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITAM2 (图12)，通过使用载体pCDH-CAR-T-EGFP作为模板的方式，通过PCR扩增来生成基因的恒定区，其中特定寡核苷酸引物的参与限制了19CAR-T-ITAM1的恒定部分。基因区域通过剪接PCR与ITGB3和ITAM2块进行融合。

[0330] 类似地，制备了具有CD28的共刺激结构域的盒，特别是：

表达盒pCDH-19CAR-T_CD28-ITGB3-ITGB3-eGFP (图16)；

表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP (图18)；

表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP (图20)；

表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP (图22)；

表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP (图24)；

表达盒pCDH-19CAR-T-CD28_ ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP (图26)。

[0331] 所得到的盒经由特异性限制性位点整合到质粒载体pCDH-eGFP内;T2A元件和作为用于表达的标记物的绿色荧光蛋白(eGFP)的开放读码框被置于同一读码框中。

[0332] 结果,产生了载体,其中CAR包括4-1BB的共刺激结构域、以及具有ITGB3和ITAM的不同组合的嵌合抗原受体的替代细胞内信号传导结构域,特别是:

载体pCDH-19CAR-T-ITGB3-ITGB3-eGFP (图1);

载体pCDH-19CAR-T-ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP (图3);

载体pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP (图5);

载体pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP (图7);

载体pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP (图11);

载体pCDH-19CAR-T -ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP (图13);

进一步地,还产生了载体,其中CAR包括CD28的共刺激结构域、以及具有ITGB3和ITAM的不同组合的嵌合抗原受体的替代细胞内信号传导结构域,特别是:

载体pCDH-19CAR-T_CD28-ITGB3-ITGB3-eGFP (图15);

载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP (图17);

载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP (图19);

载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP (图21);

载体pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP (图23);

载体pCDH-19CAR-T-CD28_ ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP (图25)。

[0333] 实施例4

T细胞的分离和激活。

[0334] 在含有肝素钠的无菌溶液的标准Vacutainer管中,从条件健康的自愿捐献者收集27 ml静脉外周血。为了制备单核细胞级分,将静脉血在其上分层的3 ml Ficoll溶液(1.077 g/L密度梯度) (PanEco,P052n)转移到无菌的15 ml离心管(Corning,430791)内。将管加盖并且在24℃的温度下以1500 rpm离心18分钟。从相界面处收集单核细胞层。为了获得T细胞(CD3+)群体,根据制造商的说明书,使用EasySep Human T Cell Enrichment Kit (Stemcell,19051),执行阴性选择免疫磁性分离。执行一轮免疫磁性分离。

[0335] 所得到的T淋巴细胞在1 ml培养基(补充有L-谷氨酰胺(Biolot,1.3.4.1) + 10%的胎牛血清(Gibco,26140079) + 100U IL2 (Ronkoleikin,LLC "NPK BIOTECH")的RPMI-1640)中进行浓缩。使用Countess® II FL细胞计数器和活力分析仪(Thermofisher,AMQAF1000)来确定T淋巴细胞浓度。将$12x10^6$个T淋巴细胞转移到补充有15 ml培养基的用于悬浮细胞培养的T75培养瓶(Eppendorf,0030711025)。加入300 ml的Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (Thermofisher,11132D),以激活T淋巴细胞。将培养小瓶置于CO_2培养箱(37^0S,5% CO_2)中72小时。

[0336] 所有工作都在无菌条件下在生物安全2级气流柜中进行。

[0337] 实施例5

通过慢病毒药物转导激活的T淋巴细胞。

[0338] 为了转导人T淋巴细胞,使用了两种慢病毒药物:第一种药物包含抗CD19-CAR-ITAMx3和GFP的基因(对照),而第二种药物(实验药物)选自实施例3中产生的载体组(图1、

图3、图5、图7、图11、图13、图15、图19、图21、图23、图25)。通过ELISA确定两种药物中的慢病毒颗粒浓度(LVP/ml)。转导以15 ml生物反应器(TPP,87017)的形式执行。浓度为50 μg/ml的硫酸鱼精蛋白(LLC Ellara)用作转导激活剂。将5x10^5个激活的T淋巴细胞、慢病毒药物(2x10^5 LVP/细胞)、硫酸鱼精蛋白和10 ml培养基引入生物反应器内,该生物反应器在Multitron振荡器(110 RPM;37℃;5% CO_2)中静置5小时。在5小时后,将生物反应器取出,并且在1500 rpm、24℃下离心5分钟。去除上清液,将沉淀物重悬浮于2 ml培养基中,转移至用于悬浮培养的6孔培养板 (Eppendorf,0030720016),并且置于CO2培养箱(37℃,5% CO_2)中。在72小时后执行转导测定。T淋巴细胞转导的效率基于GFP报告蛋白的信号水平进行确定,效率通过流式细胞术进行评估。碘化丙啶染料用于分析细胞活力。

[0339] 在直接共培养下,在表达CD19受体的靶细胞的存在下,确定了所产生的CAR T淋巴细胞的细胞毒性活性。将10,000个CAR T淋巴细胞和5,000个靶细胞(Raji)转移到用于悬浮培养的48孔板(Eppendorf,0030723015)的每个孔中的1 ml培养基(补充有L-谷氨酰胺(Biolot,1.3.4.1) + 10%胎牛血清(Gibco,26140079)的RPMI-1640)中。在CO_2培养箱(37℃,5% CO_2)中的温育时间为72小时。在流式细胞仪上执行分析,测量CD3阳性细胞/CD3阴性细胞的比率。

[0340] BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD,551809)用于分析培养基中的细胞因子水平。根据制造商的说明书进行分析。

[0341] 在与抗原相互作用期间,在细胞表面上CAR的存在促使NFAT信号传导级联的激活。使用Jurkat$^{\Delta TCRab}$ NFAT-GFP报告细胞系允许进行抗CD19-CAR-ITAMx3 (对照)的遗传构建体和实验性遗传构建体的药物的筛选,所述实验性遗传构建体选自图1、图3、图5、图7、图11、图13、图15、图17、图19、图21、图23、图25中所示的载体组)。通过电穿孔(电穿孔装置:Neon,Thermo Scientific,USA)转染报告细胞系。Raji细胞用作表达CD19受体的靶细胞,在CO_2培养箱(37^0S,5% CO_2)中的温育时间为6小时。在流式细胞仪上执行分析,测量了GFP报告蛋白的发光强度(图27)。

[0342] 实施例6

结果。

[0343] 借助于通过重组慢病毒载体的转导,我们产生了表达对照CAR-ITAMx3的CAR T和表达CAR变体之一的实验性CAR T (按照来自图1、图3、图5、图7、图11、图13、图15、图17、图19、图21、图23、图25中所示的载体组的所选载体),特别是:

CAR-(4-1BB的共刺激结构域) - (具有ITGB3x2的信号传导结构域);

CAR-(4-1BB的共刺激结构域) - (具有ITGB3x3的信号传导结构域);

CAR-(4-1BB的共刺激结构域) - (具有ITAMx2-ITGB3x1的信号传导结构域);

CAR-(4-1BB的共刺激结构域) - (具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域);

CAR-(CD28的共刺激结构域) - (具有ITGB3x2的信号传导结构域);

CAR-(CD28的共刺激结构域) - (具有ITGB3x3的信号传导结构域);

CAR-(CD28的共刺激结构域) - (具有ITAMx2-ITGB3x1的信号传导结构域);

CAR-(CD28的共刺激结构域)-(具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域)。

[0344] 实验细胞中的GFP表达水平(17.6%)与对照GFP的水平(15.63%)是可比较的。

[0345] 在实验性CAR-T与Raji系的CD19+靶细胞的直接共培养(2:1)下,我们观察到与对

照CAR-ITAMx3相比的低细胞毒性活性,其中CAR包括仅具有ITGB3x2或仅具有ITGB3x3的信号传导结构域(“CAR-(4-1BB的共刺激结构域) - (具有ITGB3x2的信号传导结构域)”;“CAR-(4-1BB的共刺激结构域) - (具有ITGB3x3的信号传导结构域)″;″CAR-(CD28的共刺激结构域) - (具有ITGB3x2的信号传导结构域)″;″CAR-(CD28的共刺激结构域) - (具有ITGB3x3的信号传导结构域)″)。

[0346] 因此,其中CAR包括仅具有ITGB3x2或仅具有ITGB3x3的信号传导结构域的上述CAR-T,被拒绝并且不是本发明的主题。

[0347] 在各种实验性CAR-ITAMx2-ITGB3x1 (″CAR-(共刺激结构域4-1BB) - (具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域)″;″CAR-(共刺激结构域CD28) - (具有ITAMx2-ITGB3x1的信号传导结构域)″)与靶Raji CD19+细胞的直接共培养(2:1)下,观察到就对照CAR-ITAMx3而言可比较的细胞毒性活性。CAR细胞的两种变体的培养伴随着促炎细胞因子IL-2和IFN-γ的分泌,其是CAR-T淋巴细胞的特性(图28 (A、B、C))。

[0348] 与上述类似,在各种实验性CAR-ITAMx1-ITGB3x2 (″CAR-(共刺激结构域4-1BB) - (具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域)″;″CAR-(共刺激结构域CD28) - (具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域)″)与靶Raji CD19+细胞的直接共培养(2:1)下,观察到就对照CAR-ITAMx3而言可比较的细胞毒性活性。

[0349] 将靶(Raji CD19+)细胞加入表达对照CAR-ITAMx3和各种实验性CAR-ITAMx1-ITGB3x2 (″CAR-(共刺激结构域4-1BB) - (具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域)″;″CAR-共刺激结构域CD28) - (具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域)″)的Jurkat$^{\Delta TCRab}$ NFAT-GFP报告细胞系中,诱导CAR介导的NFAT信号传导级联的激活。因此,在CAR受体内的合成激活结构域的存在并不导致表达相应遗传构建体的细胞的CAR依赖性激活的显著降低(图29)。

[0350] 与上述类似,将靶(Raji CD19+)细胞加入表达对照CAR-ITAMx3和各种实验性CAR-ITAMx1-ITGB3x2 (″CAR-(共刺激结构域4-1BB) - (具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域)″;″CAR-共刺激结构域CD28) - (具有ITAMx1-ITGB3x2的信号传导结构域)″)的Jurkat$^{\Delta TCRab}$ NFAT-GFP报告细胞系中,诱导CAR介导的NFAT信号传导级联的激活。因此,在CAR受体内的合成激活结构域的存在并不导致表达相应遗传构建体的细胞的CAR依赖性激活的显著降低。

序列表

<110> OBSHCHESTVO S OGRANICHENNOJ OTVETSTVENNOSTYU "ANABION"

<120> 嵌合抗原受体的替代细胞内信号传导结构域

<150> RU2019107136
<151> 13-03-2019

<160> 35

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITAM1序列

<400> 1
Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
1 5 10 15
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
20 25

[0001]

<210> 2
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITAM2序列

<400> 2
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
1 5 10 15
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
20 25

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITAM3序列

<400> 3
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
1 5 10 15
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln

20 25

<210> 4
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITGB3序列

<400> 4
Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr
1 5 10 15
Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
20

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITAM1 - ITAM2 - ITGB3序列

<400> 5
[0002]
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Asp Thr
65 70 75 80
Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile
85 90 95
Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Leu Pro Pro Arg
100 105

<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITGB3 - ITAM2 - ITAM3序列

<400> 6
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu
1 5 10 15
Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
20 25 30

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
35 40 45
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
50 55 60
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
65 70 75 80
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
85 90 95
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITGB3 - ITAM2 - ITAM3序列

<400> 7
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
[0003] Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr
50 55 60
Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
65 70 75 80
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
85 90 95
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105

<210> 8
<211> 101
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITAM1 - ITGB3 - ITGB3序列

<400> 8
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr
50 55 60
Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Lys Gly Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu
65 70 75 80

Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
85 90 95
Ala Leu Pro Pro Arg
100

<210> 9
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITGB3 - ITAM2 - ITGB3序列

<400> 9
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu
1 5 10 15
Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
20 25 30
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
35 40 45
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
50 55 60
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr
65 70 75 80
Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Ala
85 90 95
[0004] Leu Pro Pro Arg
100

<210> 10
<211> 101
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工ITGB3-ITGB3 - ITAM3序列

<400> 10
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu
1 5 10 15
Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
20 25 30
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Asp Thr Ala Asn Asn Pro
35 40 45
Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly
50 55 60
Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
65 70 75 80
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
85 90 95
Ala Leu Pro Pro Arg
100

<210> 11

<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 对于CD19肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域的人工序列

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly
100 105 110
Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys
115 120 125
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser
130 135 140
[0005] Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser
145 150 155 160
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
165 170 175
Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
180 185 190
Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
195 200 205
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr
210 215 220
Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD8跨膜结构域的人工序列

<400> 12
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 13
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28共刺激结构域的人工序列

<400> 13
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
1 5 10 15
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
20 25 30
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
35 40 45
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
50 55 60
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
65 70 75 80
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
85 90 95
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val
100 105 110
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
115 120 125
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
[0006] 130 135 140
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
145 150 155 160
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
165 170 175
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
180 185 190
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
195 200 205
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
210 215 220

<210> 14
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB共刺激结构域的人工序列

<400> 14
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 15
<211> 669
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19CAR-T-CD28-cd3dζ (ITGB3-ITAM2 - ITAM3)序列

<400> 15

[0007]

```
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1               5                  10                  15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
    50                  55                  60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65                  70                  75                  80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
                85                  90                  95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
            100                 105                 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
    130                 135                 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145                 150                 155                 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
                165                 170                 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
            340                 345                 350
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
```

[0008]

```
          355                 360                 365
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
    370                 375                 380
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
385                 390                 395                 400
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
                405                 410                 415
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
            420                 425                 430
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val
        435                 440                 445
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
    450                 455                 460
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
465                 470                 475                 480
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
                485                 490                 495
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
            500                 505                 510
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
        515                 520                 525
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
    530                 535                 540
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Val
545                 550                 555                 560
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys
                565                 570                 575
Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Arg Gly
            580                 585                 590
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
        595                 600                 605
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
    610                 615                 620
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
625                 630                 635                 640
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
                645                 650                 655
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
            660                 665
```

<210> 16
<211> 670
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-CD28-cd3dζ (ITAM1-ITGB3 - ITAM3)序列

<400> 16

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

[0009]

```
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
    50                  55                  60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65                  70                  75                  80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
                85                  90                  95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
            100                 105                 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
    130                 135                 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145                 150                 155                 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
                165                 170                 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
            340                 345                 350
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
        355                 360                 365
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
    370                 375                 380
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
385                 390                 395                 400
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
                405                 410                 415
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
            420                 425                 430
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val
        435                 440                 445
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
    450                 455                 460
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
465                 470                 475                 480
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
                485                 490                 495
```

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
500 505 510
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
515 520 525
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
530 535 540
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Val
545 550 555 560
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
565 570 575
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
580 585 590
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Asp Thr
595 600 605
Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile
610 615 620
Thr Tyr Arg Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
625 630 635 640
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
645 650 655
Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
660 665 670

<210> 17
<211> 669
<212> PRT
<213> 人工序列

[0010]

<220>
<223> 人工19CAR-T-CD28-cd3dζ (ITAM1-ITAM2 - ITGB3)序列

<400> 17
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu

[0011]

```
                180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
            340                 345                 350
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
        355                 360                 365
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
    370                 375                 380
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
385                 390                 395                 400
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
                405                 410                 415
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
            420                 425                 430
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val
        435                 440                 445
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
    450                 455                 460
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
465                 470                 475                 480
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
                485                 490                 495
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
            500                 505                 510
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
        515                 520                 525
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
    530                 535                 540
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Val
545                 550                 555                 560
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
                565                 570                 575
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
            580                 585                 590
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
        595                 600                 605
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
    610                 615                 620
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Asp Thr Ala Asn
```

625 630 635 640
Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr
645 650 655
Arg Gly Thr Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
660 665

<210> 18
<211> 664
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-CD28-cd3dζ (ITGB3-ITGB3 - ITAM3)序列

<400> 18
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95
[0012] Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
210 215 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
275 280 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

[0013]

```
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
            340                 345                 350
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
        355                 360                 365
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
    370                 375                 380
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
385                 390                 395                 400
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
                405                 410                 415
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
            420                 425                 430
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val
        435                 440                 445
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
    450                 455                 460
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
465                 470                 475                 480
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
                485                 490                 495
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
            500                 505                 510
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
        515                 520                 525
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
    530                 535                 540
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Val
545                 550                 555                 560
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys
                565                 570                 575
Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Arg Gly
            580                 585                 590
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr
        595                 600                 605
Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Lys
    610                 615                 620
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
625                 630                 635                 640
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
                645                 650                 655
Pro Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
            660
```

<210> 19
<211> 664
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-CD28-cd3dζ (ITAM1-ITGB3 - ITGB3)序列

<400> 19

```
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
```

[0014]

```
1               5                   10                  15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
    50                  55                  60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65                  70                  75                  80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
                85                  90                  95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
            100                 105                 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
    130                 135                 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145                 150                 155                 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
                165                 170                 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
            340                 345                 350
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
        355                 360                 365
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
    370                 375                 380
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
385                 390                 395                 400
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
                405                 410                 415
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
            420                 425                 430
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val
        435                 440                 445
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
```

```
     450                 455                 460
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
465                 470                 475                 480
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
                485                 490                 495
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
            500                 505                 510
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
        515                 520                 525
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
    530                 535                 540
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Val
545                 550                 555                 560
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
                565                 570                 575
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
            580                 585                 590
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Asp Thr
        595                 600                 605
Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile
    610                 615                 620
Thr Tyr Arg Gly Thr Lys Gly Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys
625                 630                 635                 640
Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Leu
                645                 650                 655
Pro Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
            660
```

[0015]

<210> 20
<211> 663
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-CD28-cd3dζ (ITGB3-ITAM2 - ITGB3)序列

<400> 20

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

[0016]

```
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145                 150                 155                 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
                165                 170                 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
            340                 345                 350
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
        355                 360                 365
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
    370                 375                 380
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
385                 390                 395                 400
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
                405                 410                 415
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
            420                 425                 430
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val
        435                 440                 445
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
    450                 455                 460
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
465                 470                 475                 480
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
                485                 490                 495
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
            500                 505                 510
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
        515                 520                 525
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
    530                 535                 540
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Val
545                 550                 555                 560
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys
                565                 570                 575
Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Arg Gly
            580                 585                 590
```

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
595 600 605
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
610 615 620
Glu Ile Gly Met Lys Gly Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu
625 630 635 640
Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Leu Pro
645 650 655
Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
660

<210> 21
<211> 489
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-41bb-cd3dζ (ITGB3-ITAM2 - ITAM3)序列

<400> 21
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45
[0017] Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
210 215 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser

```
          275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
      290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                  325                 330                 335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
              340                 345                 350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
          355                 360                 365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
      370                 375                 380
Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser
385                 390                 395                 400
Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Arg Gly Arg Asp Pro Glu
                  405                 410                 415
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
              420                 425                 430
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
          435                 440                 445
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
      450                 455                 460
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
465                 470                 475                 480
Leu Pro Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
                  485
```

[0018]

<210> 22
<211> 490
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-41bb-cd3dζ (ITAM1-ITGB3 - ITAM3)序列

<400> 22

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

[0019]

```
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145                 150                 155                 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
                165                 170                 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
            340                 345                 350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
        355                 360                 365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
    370                 375                 380
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385                 390                 395                 400
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
                405                 410                 415
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Asp Thr Ala Asn Asn Pro
            420                 425                 430
Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly
        435                 440                 445
Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
    450                 455                 460
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
465                 470                 475                 480
Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
                485                 490
```

<210> 23
<211> 489
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-41bb-cd3dζ (ITAM1-ITAM2 - ITGB3)序列

<400> 23
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

[0020]

```
1               5                   10                  15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
    50                  55                  60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65                  70                  75                  80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
                85                  90                  95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
            100                 105                 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
    130                 135                 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145                 150                 155                 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
                165                 170                 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
            340                 345                 350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
        355                 360                 365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
    370                 375                 380
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385                 390                 395                 400
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
                405                 410                 415
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
            420                 425                 430
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
        435                 440                 445
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr
```

```
    450                 455                 460
Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Ala
465                 470                 475                 480
Leu Pro Pro Arg Gly Ser Ala Ala Ala
                485
```

<210> 24
<211> 484
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-41bb-cd3dζ (ITGB3-ITGB3 - ITAM3)序列

<400> 24

```
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1               5                   10                  15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
    50                  55                  60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65                  70                  75                  80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
                85                  90                  95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
            100                 105                 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
    130                 135                 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145                 150                 155                 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
                165                 170                 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
```

[0021]

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
340 345 350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380
Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser
385 390 395 400
Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Arg Gly Arg Asp Pro Glu
405 410 415
Met Gly Gly Lys Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr
420 425 430
Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg
435 440 445
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
450 455 460
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly
465 470 475 480
Ser Ala Ala Ala

<210> 25
<211> 484
<212> PRT
<213> 人工序列

[0022]

<220>
<223> 人工19KAR-T-41bb-cd3dζ (ITAM1-ITGB3 - ITGB3)序列

<400> 25
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175

[0023]

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

<210> 26
<211> 483
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工19KAR-T-41bb-cd3dζ (ITGB3-ITAM2 - ITGB3)序列

<400> 26

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

[0024]

```
          35                  40                  45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
      50                  55                  60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65                  70                  75                  80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
                85                  90                  95
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
            100                 105                 110
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
    130                 135                 140
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145                 150                 155                 160
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
                165                 170                 175
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
            180                 185                 190
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
        195                 200                 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
    210                 215                 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
            340                 345                 350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
        355                 360                 365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
    370                 375                 380
Ser Ala Asp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser
385                 390                 395                 400
Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Arg Gly Arg Asp Pro Glu
                405                 410                 415
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
            420                 425                 430
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
        435                 440                 445
Lys Gly Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr
    450                 455                 460
Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser
465                 470                 475                 480
Ala Ala Ala
```

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工CD3 ζ序列

<400> 27
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

[0025]

<210> 28
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工CD8铰链序列

<400> 28
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 29
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前导肽的人工序列

<400> 29
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro
20

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 对于CD19肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域的可变轻链结构域(VL)的人工序列

<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
[0026] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
100 105

<210> 31
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 对于CD19肿瘤抗原特异性的抗原结合结构域的可变重链结构域(VH)的人工序列

<400> 31
Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工接头序列

<400> 32
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 33
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工T2A序列

<400> 33
[0027]
Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
1 5 10 15
Gly Pro

<210> 34
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工eGFP序列

<400> 34
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60
Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

```
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
        115                 120                 125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
    130                 135                 140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145                 150                 155                 160
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
            180                 185                 190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
        195                 200                 205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
    210                 215                 220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225                 230                 235
```

[0028]

<210> 35
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD8铰链结构域的人工序列

<400> 35

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

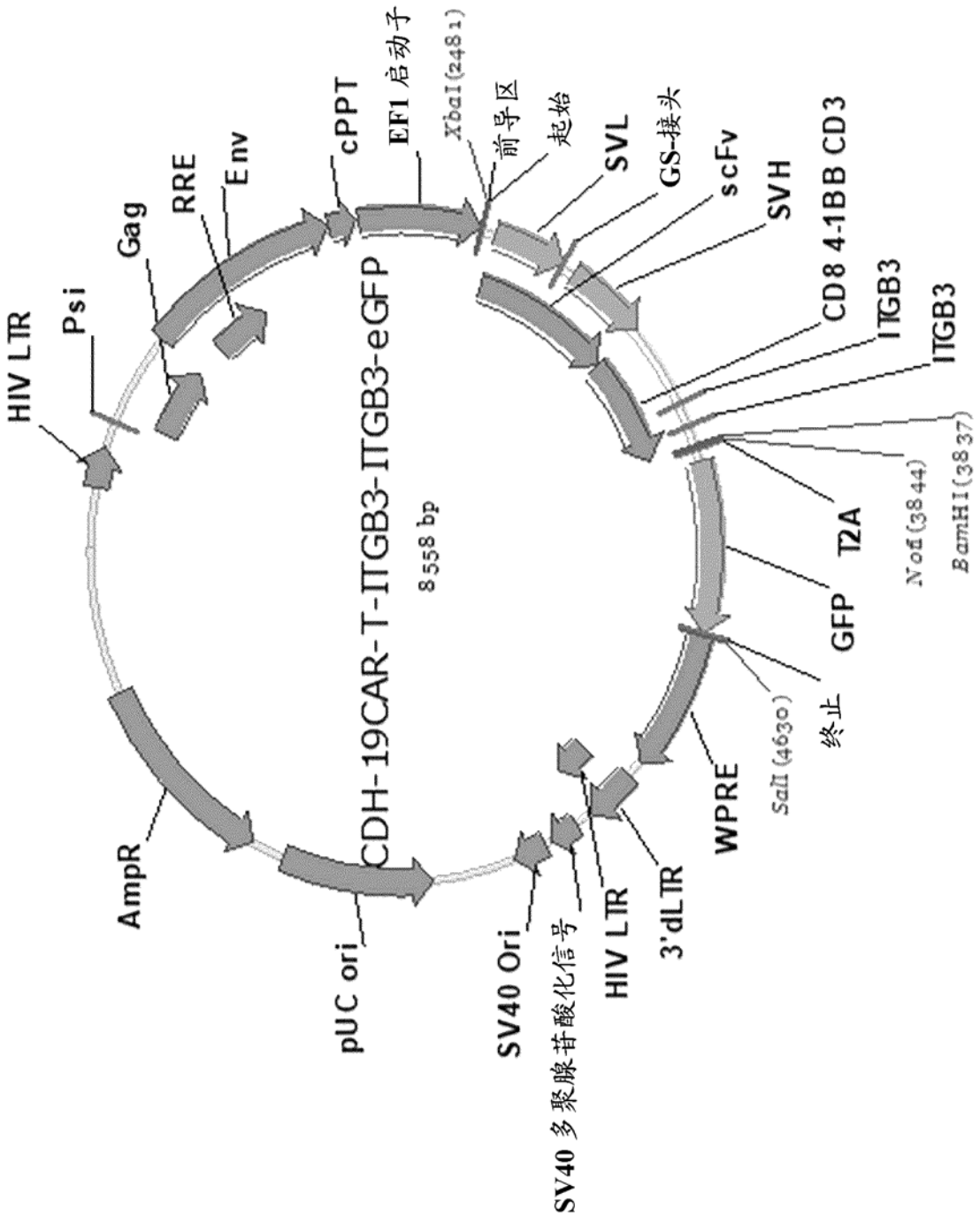

CDH-19CAR-T-ITGB3-ITGB3-eGFP
8558 bp
HIV LTR
Psi
Gag
RRE
Env
cPPT
EF1 启动子
XbaI(2481)
前导区
起始
SVL
GS-接头
scFv
SVH
CD8 4-1BB CD3
ITGB3
ITGB3
T2A
NotI(3844)
BamHI(3837)
GFP
终止
SalI(4630)
WPRE
3'dLTR
HIV LTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
pUC ori
AmpR

图 1

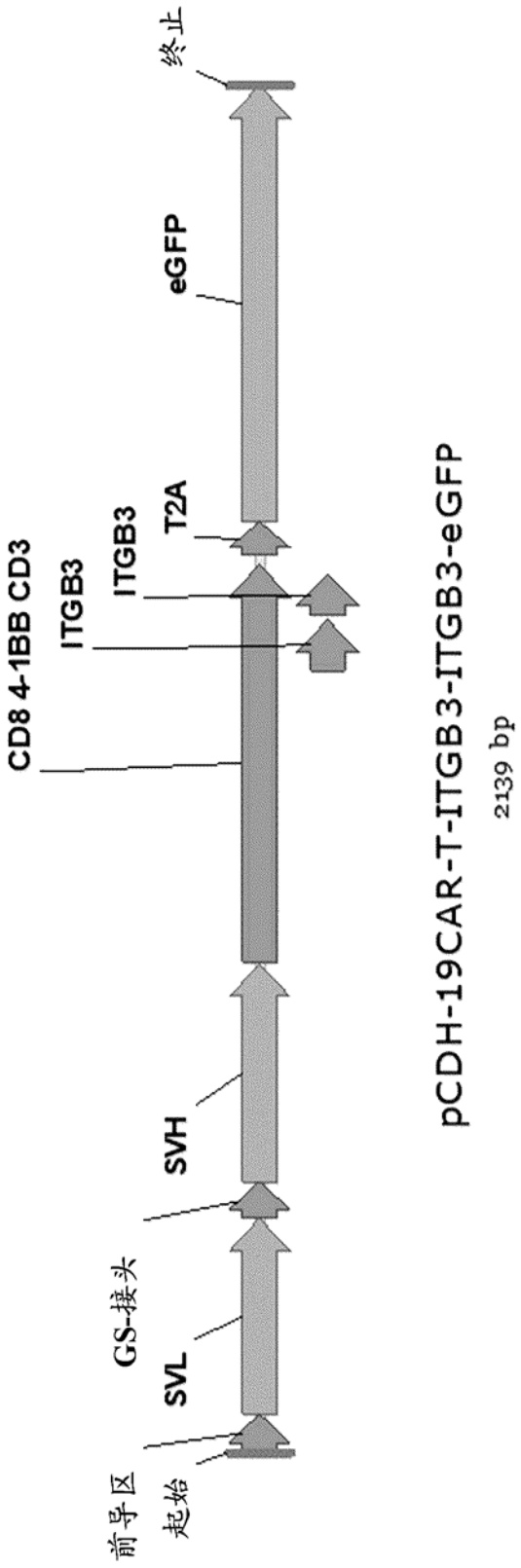

终止
eGFP
T2A
ITGB3
ITGB3
CD8 4-1BB CD3
SVH
GS-接头
SVL
前导区
起始
pCDH-19CAR-T-ITGB3-ITGB3-eGFP
2139 bp

图 2

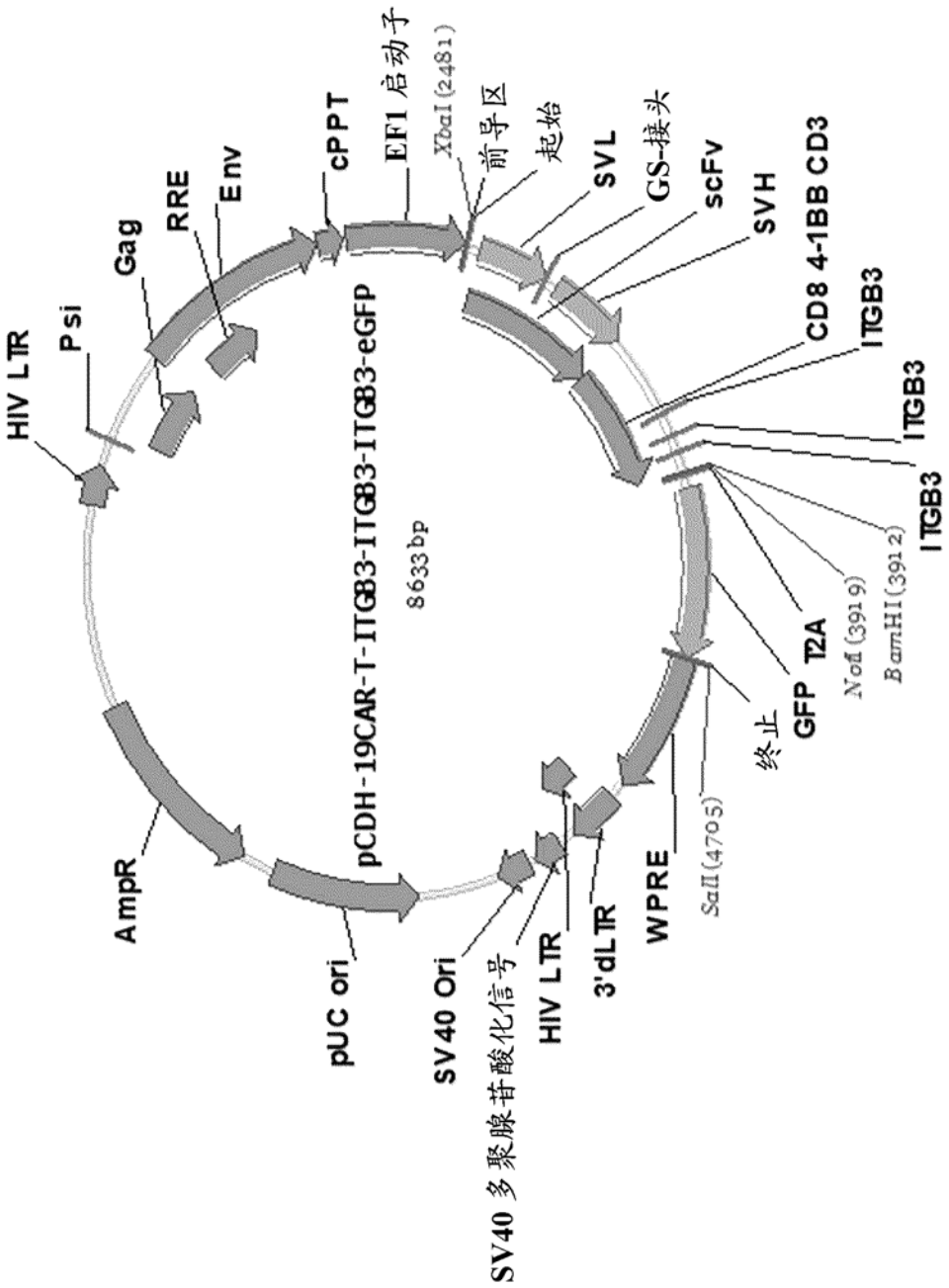

pCDH-19CAR-T-ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP
8633 bp
HIV LTR
Psi
Gag
RRE
Env
cPPT
EF1 启动子
XbaI(2481)
前导区
起始
SVL
GS-接头
scFv
SVH
CD8 4-1BB CD3
ITGB3
ITGB3
ITGB3
T2A
NotI(3919)
BamHI(3912)
GFP
终止
SalI(4705)
WPRE
3'dLTR
HIV LTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
pUC ori
AmpR

图 3

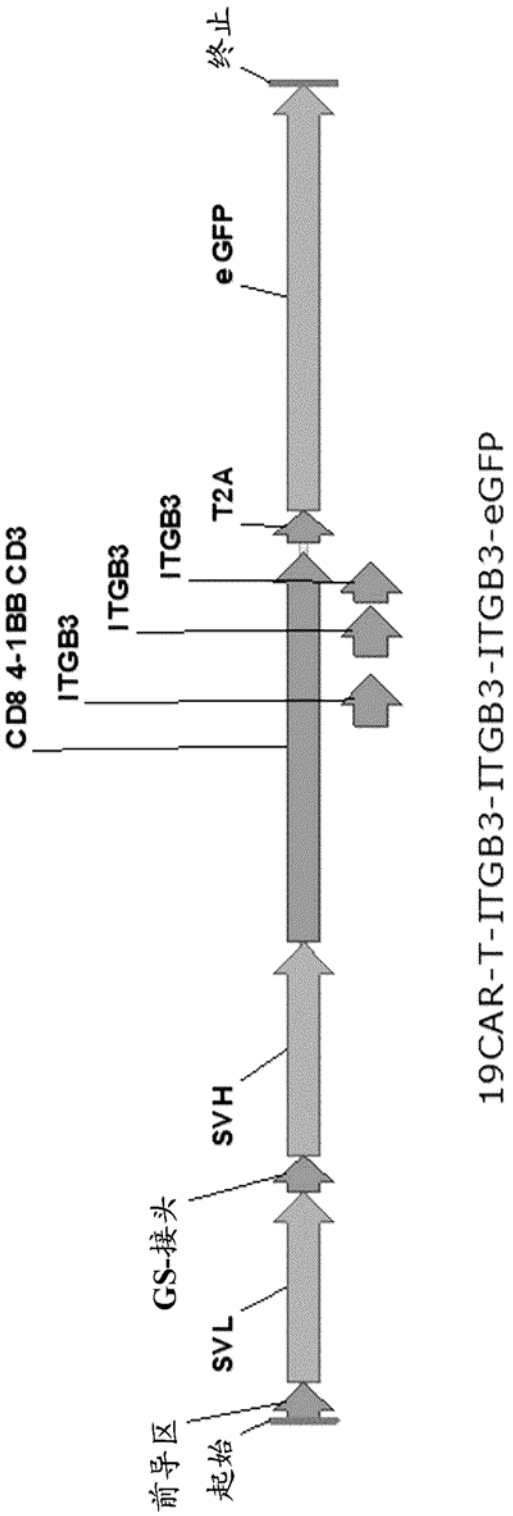

终止
eGFP
T2A
ITGB3
ITGB3
ITGB3
CD8 4-1BB CD3
SVH
GS-接头
SVL
前导区
起始
19CAR-T-ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP
2214 bp

图 4

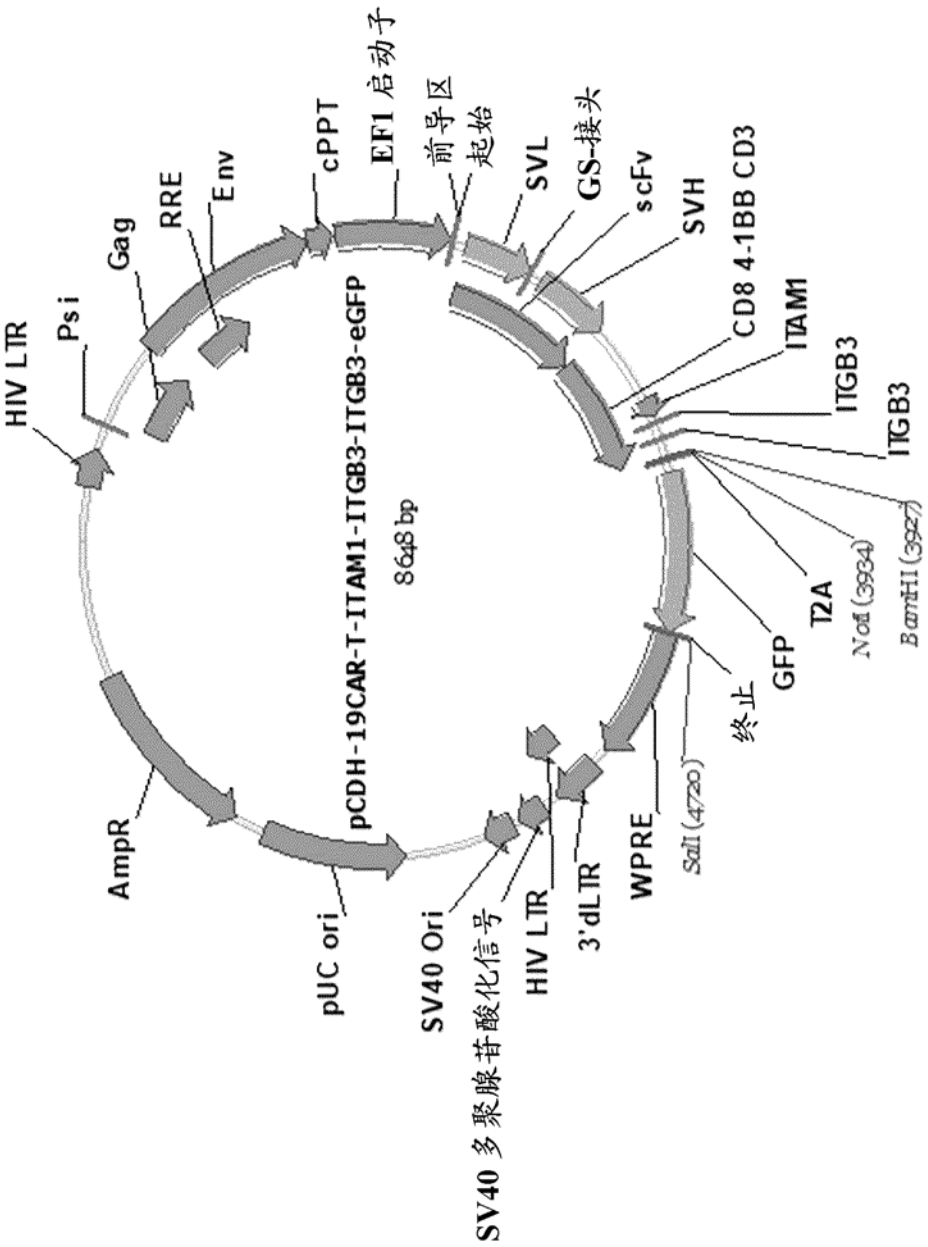

pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP
8648 bp
HIV LTR
Psi
Gag
RRE
Env
cPPT
EF1 启动子
前导区
起始
SVL
GS-接头
scFv
SVH
CD8 4-1BB CD3
ITAM1
ITGB3
ITGB3
T2A
NotI (3934)
BamHI (3927)
GFP
终止
SalI (4720)
WPRE
3'dLTR
HIV LTR
SV40 Ori
SV40 多聚腺苷酸化信号
pUC ori
AmpR

图 5

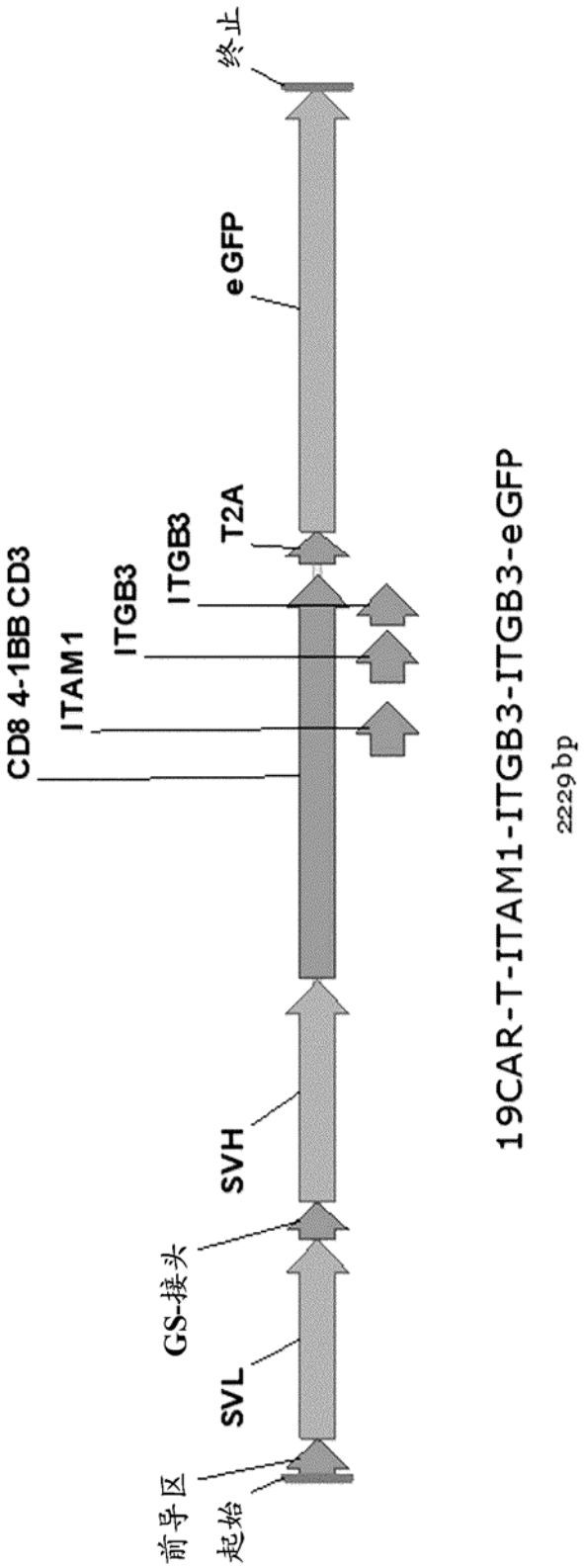

终止
eGFP
T2A
ITGB3
ITGB3
ITAM1
CD8 4-1BB CD3
SVH
GS-接头
SVL
前导区
起始
19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP
2229bp

图 6

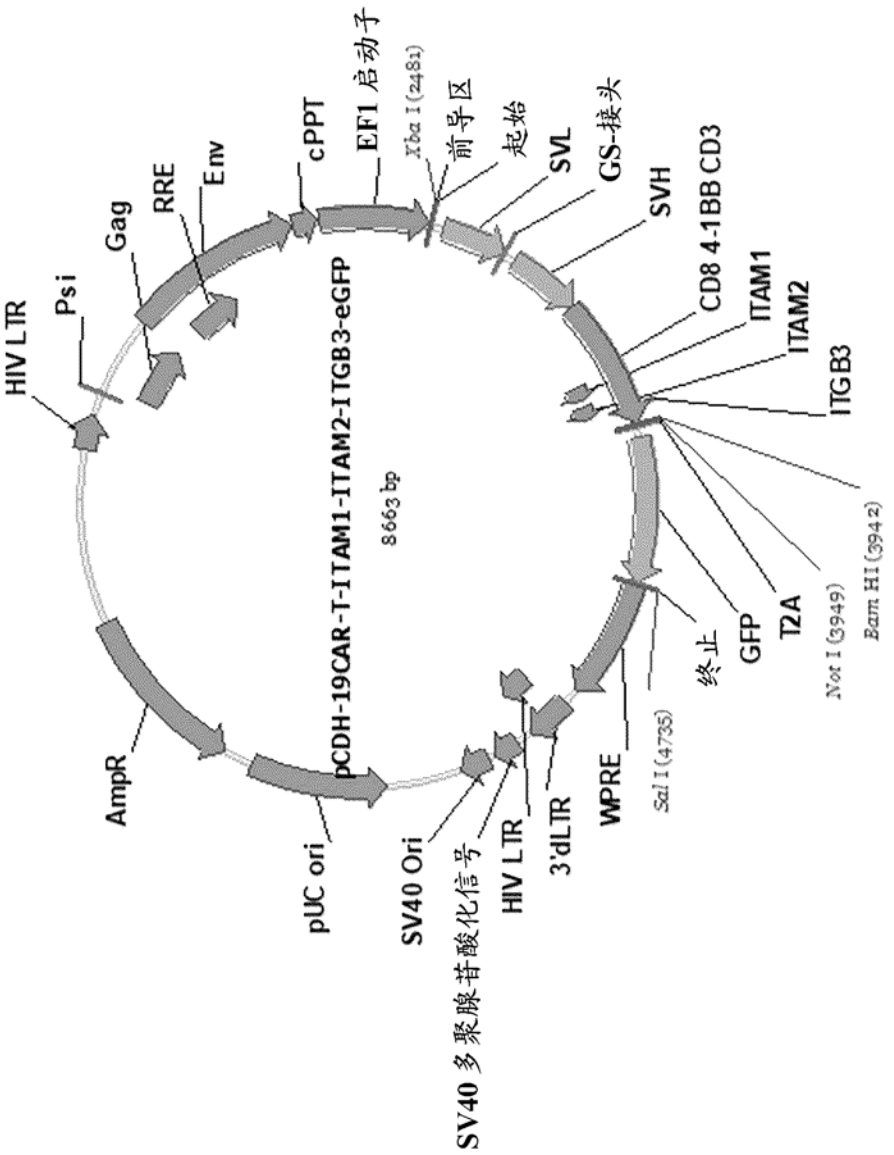

HIV LTR
Psi
Gag
RRE
Env
cPPT
EF1 启动子
Xba I (2481)
前导区
起始
SVL
GS-接头
SVH
CD8 4-1BB CD3
ITAM1
ITAM2
ITGB3
Bam HI (3942)
Not I (3949)
T2A
GFP
终止
Sal I (4735)
WPRE
3'dLTR
HIV LTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
pUC ori
AmpR
pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP
8663 bp

图 7

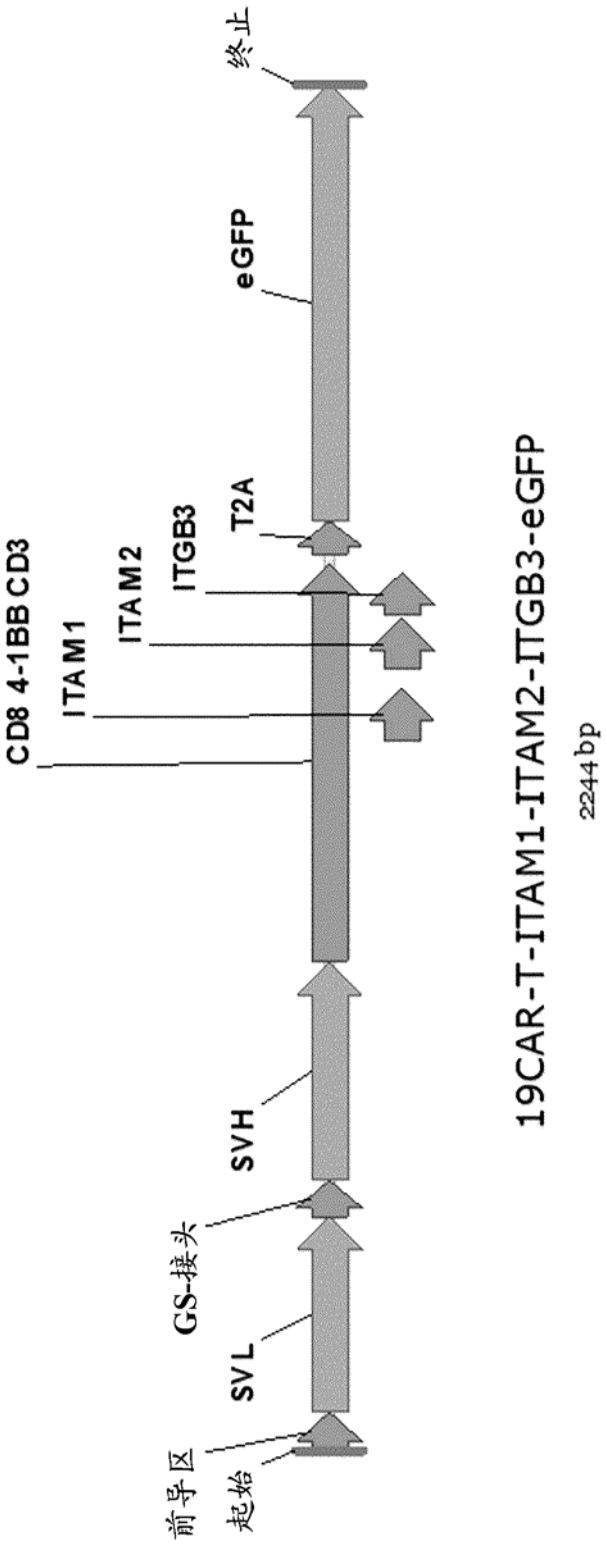

前导区
起始
SVL
GS-接头
SVH
CD8 4-1BB CD3
ITAM1
ITAM2
ITGB3
T2A
eGFP
终止
19CAR-T-ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP
2244bp

图 8

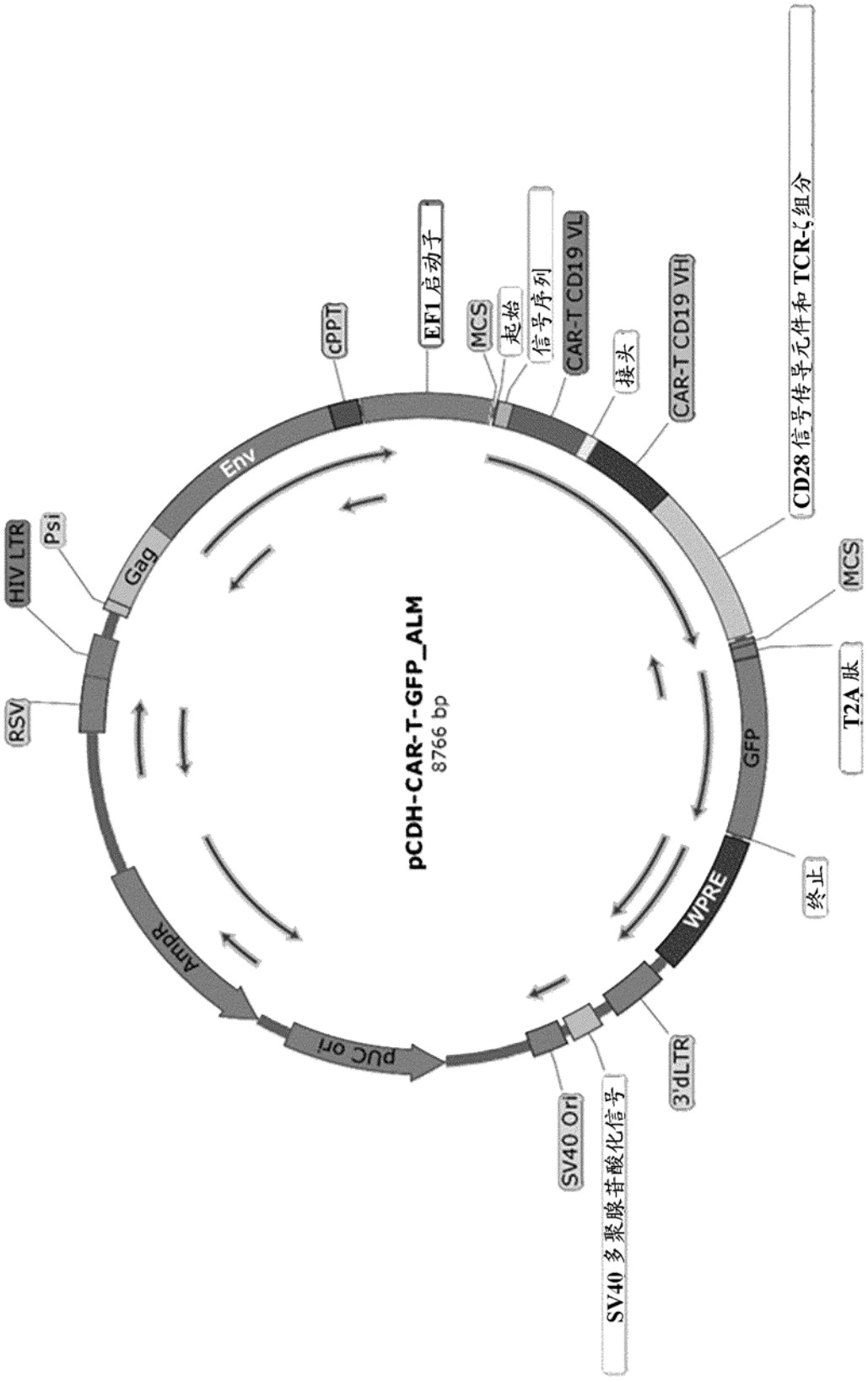

pCDH-CAR-T-GFP_ALM
8766 bp
HIV LTR
Psi
Gag
Env
cPPT
EF1启动子
MCS
起始
信号序列
CAR-T CD19 VL
接头
CAR-T CD19 VH
CD28信号传导元件和TCR-ζ组分
MCS
T2A肽
GFP
WPRE
终止
3'dLTR
SV40 Ori
SV40多聚腺苷酸化信号
pUC ori
AmpR
RSV

图 9

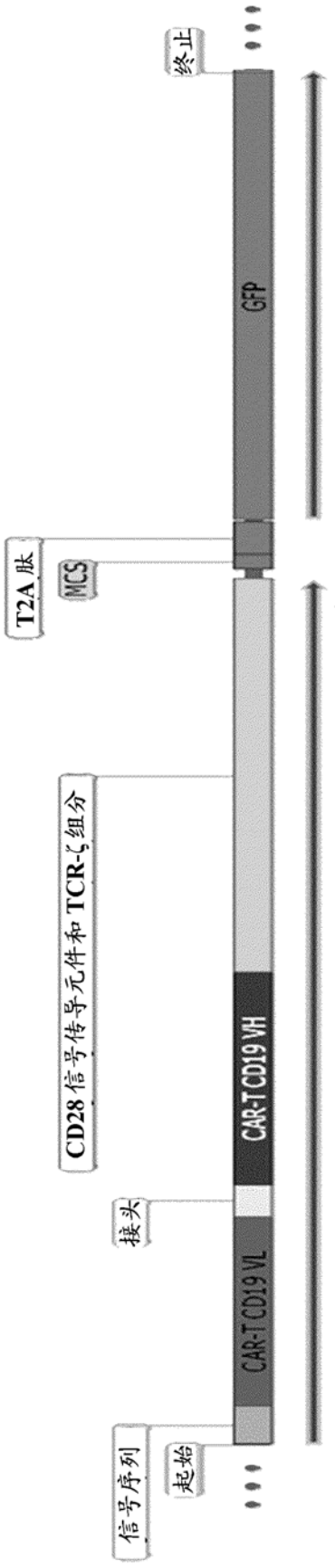

信号序列
起始
CAR-TCD19 VL
接头
CAR-TCD19 VH
CD28信号传导元件和TCR-ζ组分
T2A肽
MCS
GFP
终止

图 10

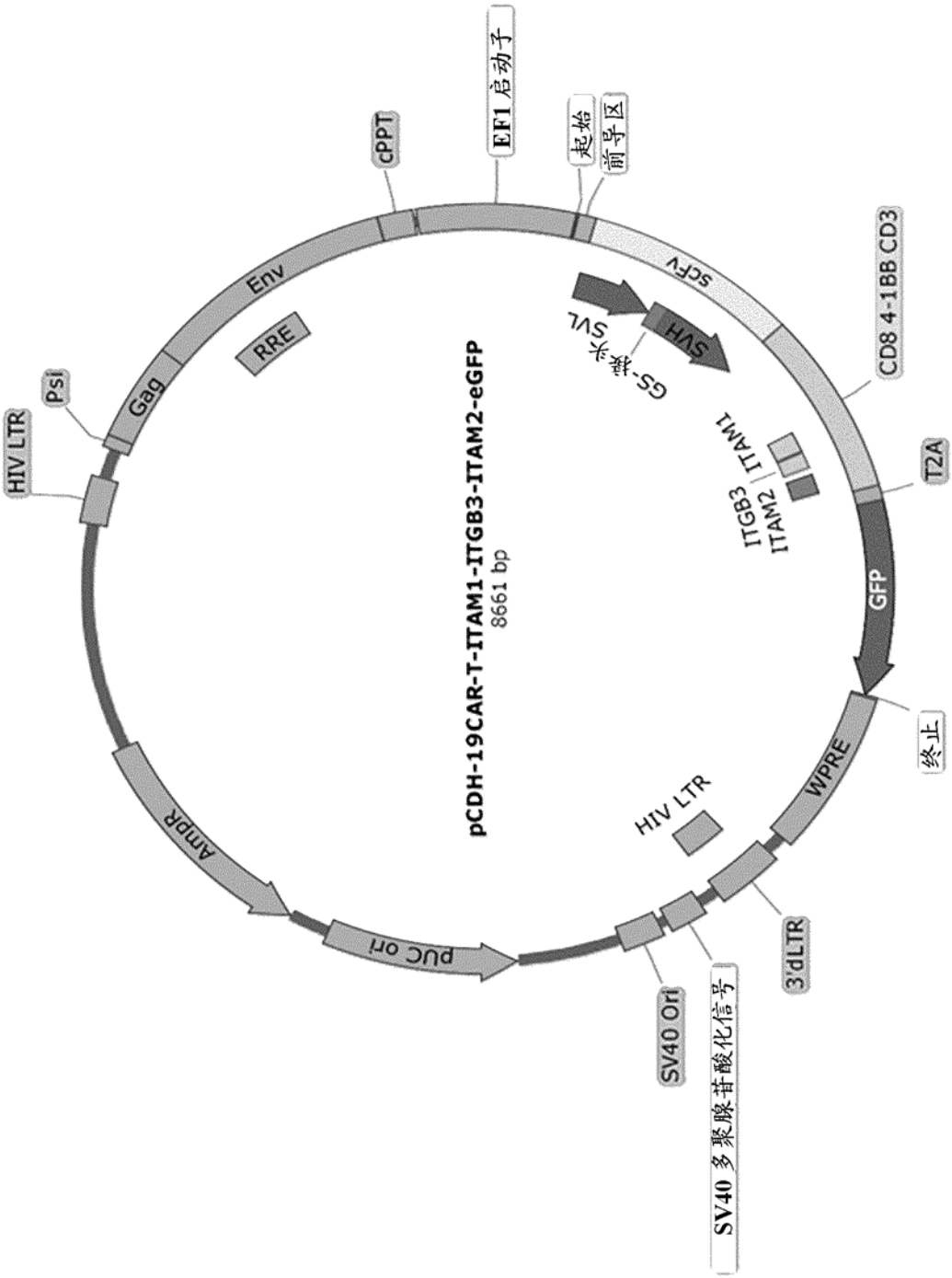

pCDH-19CAR-T-ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP
8661 bp
cPPT
EF1启动子
起始
前导区
scFv
CD8 4-1BB CD3
T2A
GFP
终止
WPRE
3'dLTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
HIV LTR
AmpR
PUC ori
HIV LTR
ITGB3
ITAM2
ITAM1
GS-接头
SVH
SVL
RRE
Env
Gag
Psi
HIV LTR

图 11

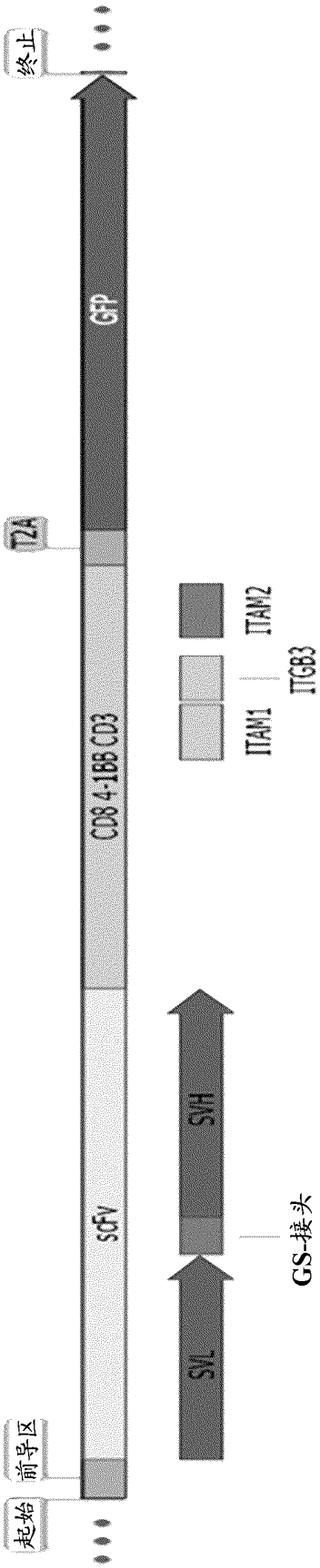

终止
CFP
T2A
CD8 4-1BB CD3
ITAM2
ITGB3
ITAM1
scFv
SVH
GS-接头
SVL
前导区
起始

图 12

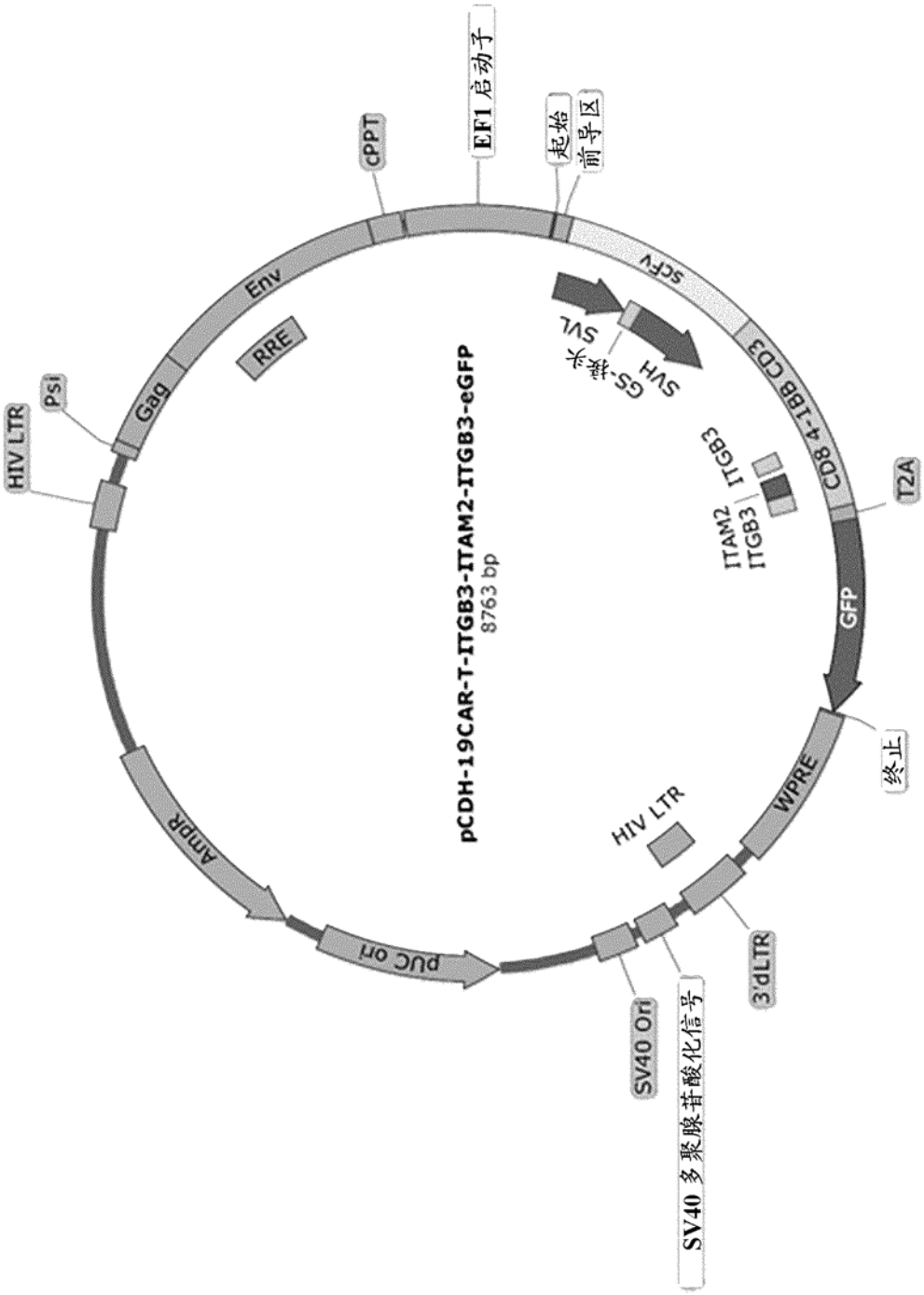

pCDH-19CAR-T-ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP
8763 bp
EF1 启动子
起始
前导区
cPPT
Env
RRE
Gag
Psi
HIV LTR
scFv
GS-接头
SVL
SVH
CD8 4-1BB CD3
ITAM2
ITGB3
ITGB3
T2A
GFP
终止
WPRE
3'dLTR
HIV LTR
SV40 Ori
SV40 多聚腺苷酸化信号
pUC ori
AmpR

图 13

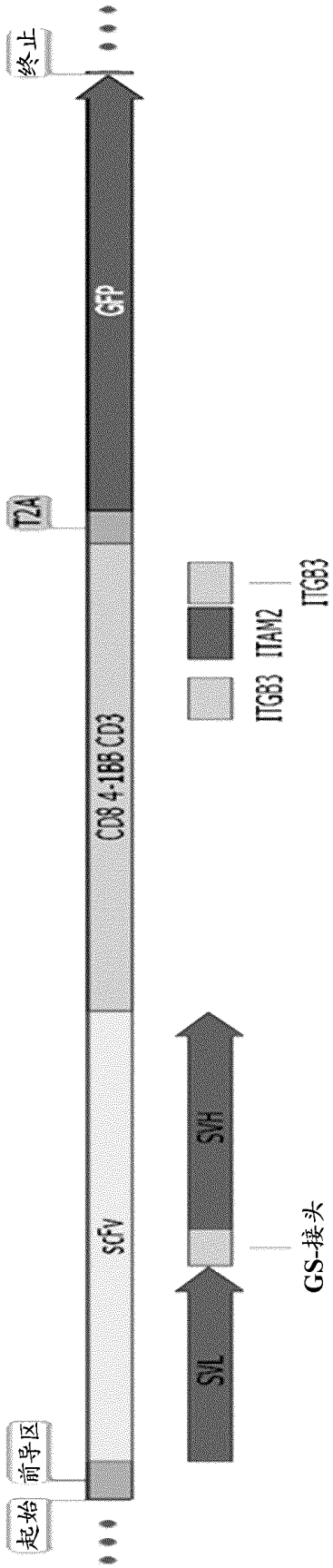

终止
GFP
T2A
CD8 4-1BB CD3
ITGB3
ITAM2
ITGB3
scFv
VH
GS-接头
VL
前导区
起始

图 14

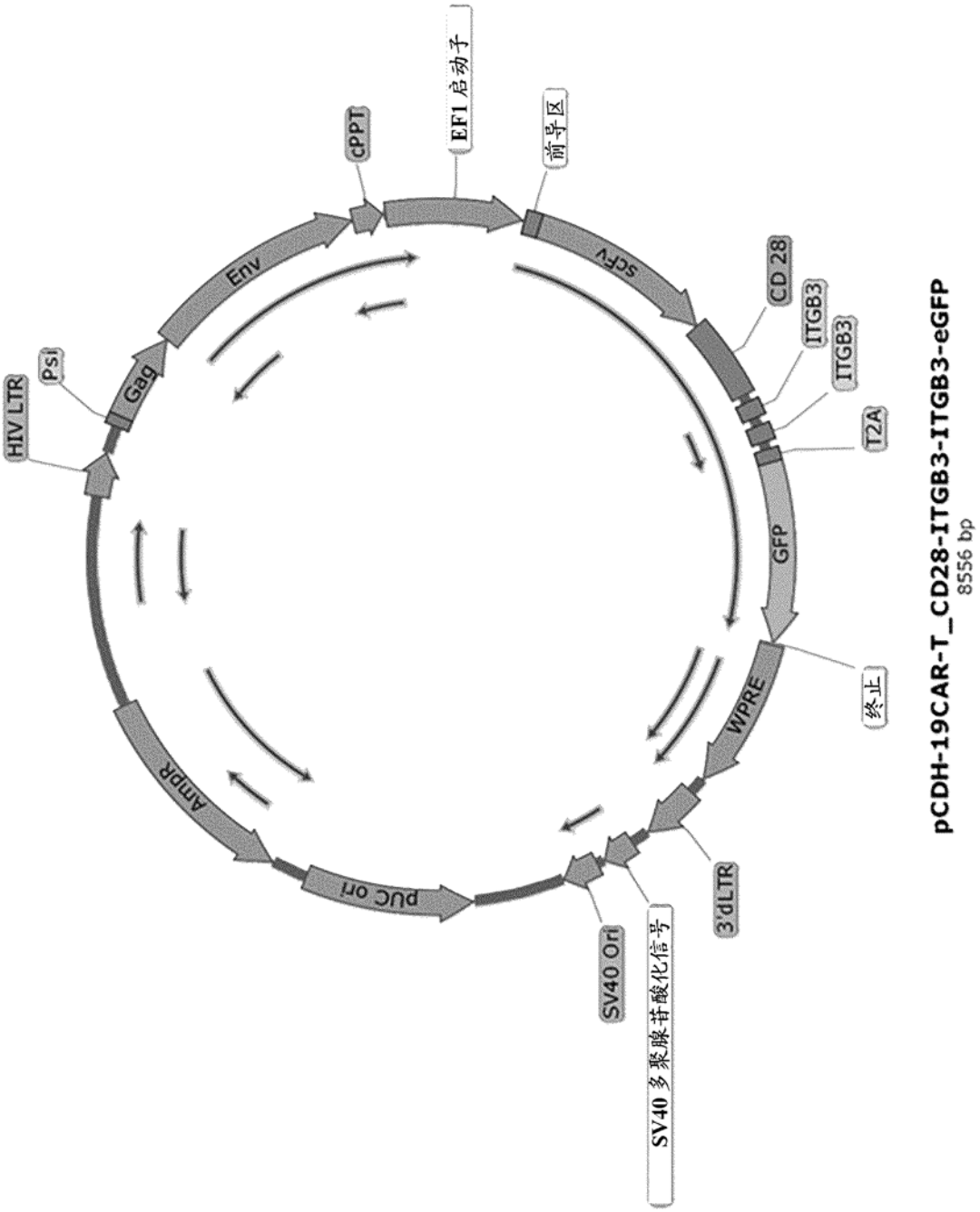

cPPT
EF1 启动子
前导区
scFv
CD 28
ITGB3
ITGB3
T2A
GFP
终止
WPRE
3'dLTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
pUC ori
AmpR
HIV LTR
Psi
Gag
Env
pCDH-19CAR-T_CD28-ITGB3-ITGB3-eGFP
8556 bp

图 15

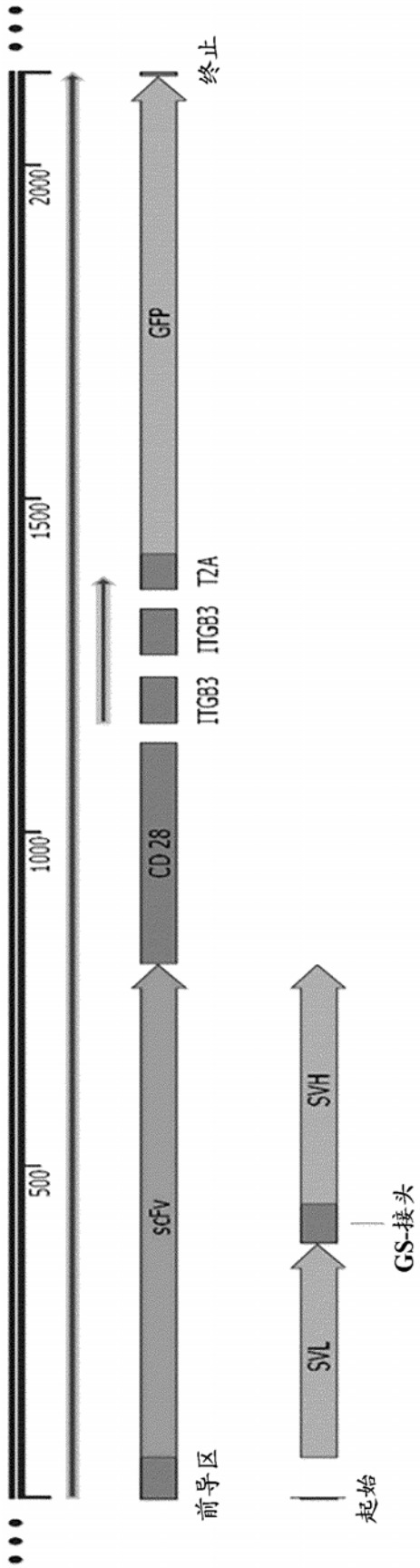

500
1000
1500
2000
scFv
CD28
ITGB3
ITGB3
T2A
GFP
终止
前导区
SVL
GS-接头
SVH
起始

图 16

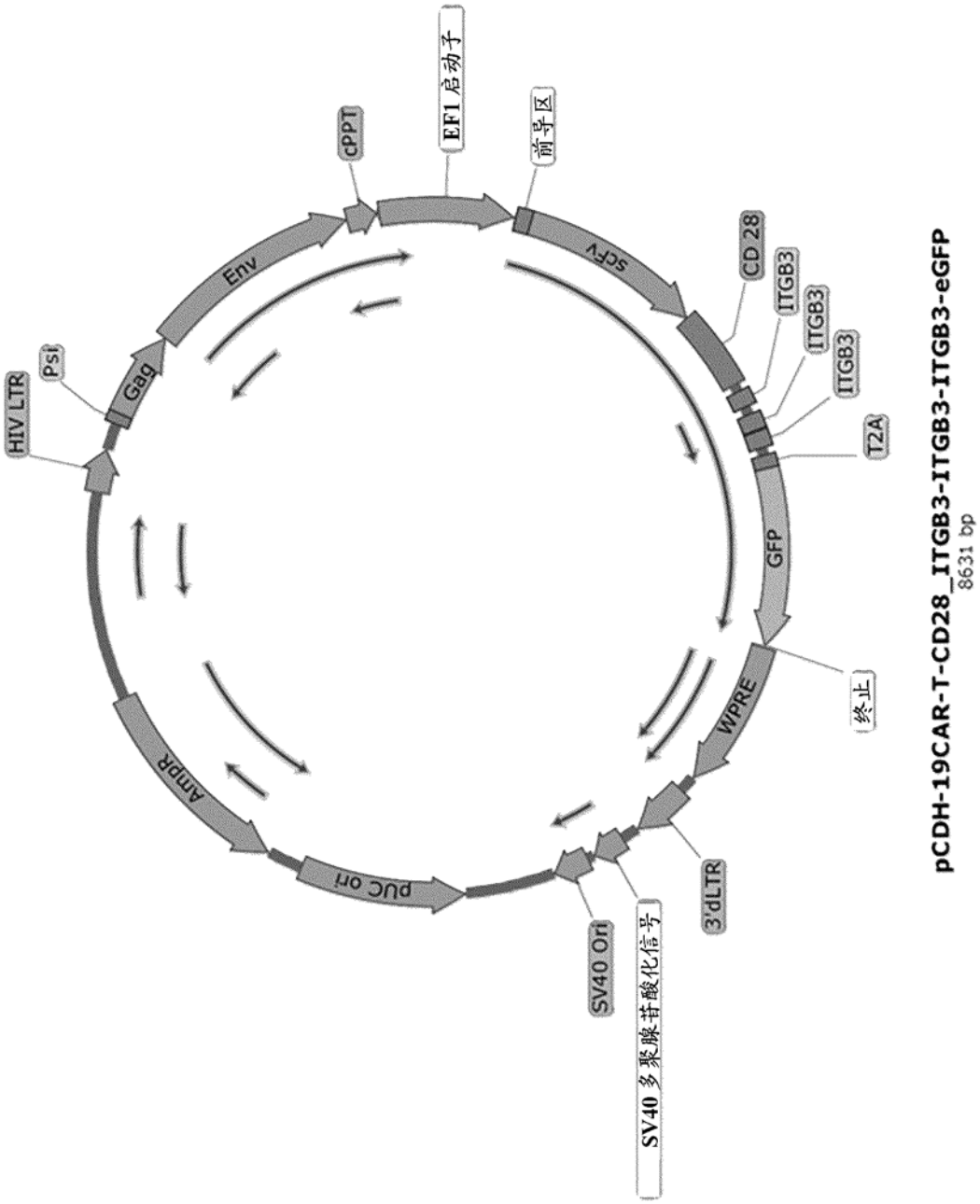

cPPT
EF1 启动子
前导区
scFv
CD 28
ITGB3
ITGB3
ITGB3
T2A
GFP
WPRE
终止
3'dLTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
pUC ori
AmpR
HIV LTR
Psi
Gag
Env
pCDH-19CAR-T-CD28_ITGB3-ITGB3-ITGB3-eGFP
8631 bp

图 17

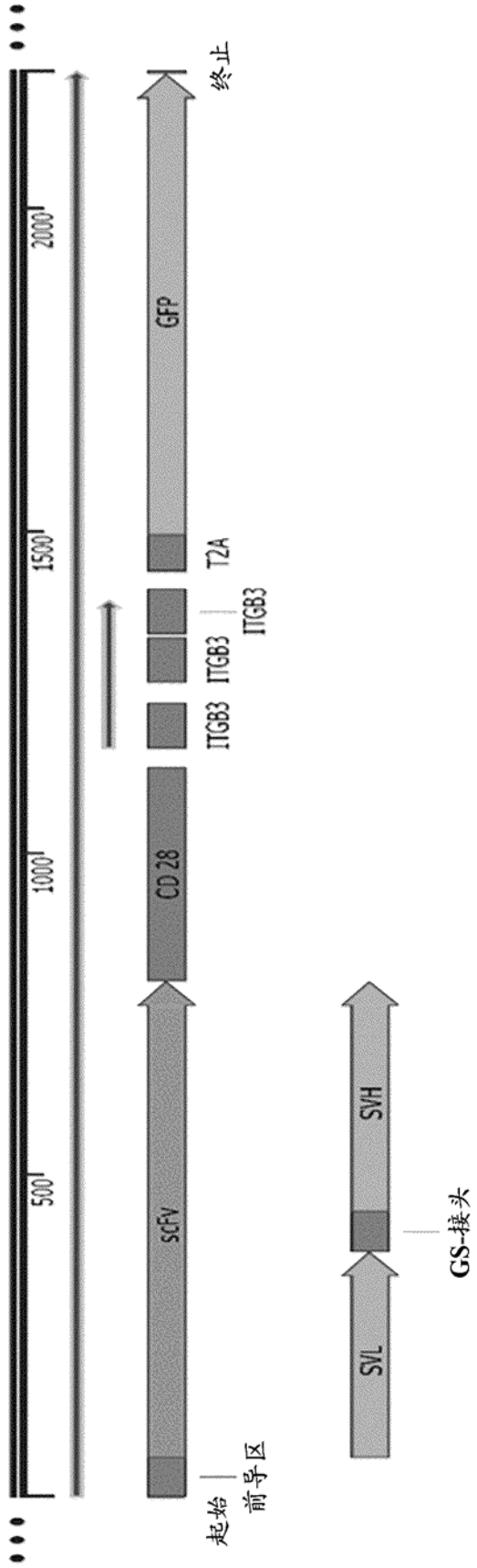

500
1000
1500
2000
起始
前导区
scFV
CD 28
ITGB3
ITGB3
ITGB3
T2A
GFP
终止
SVL
GS-接头
SVH

图 18

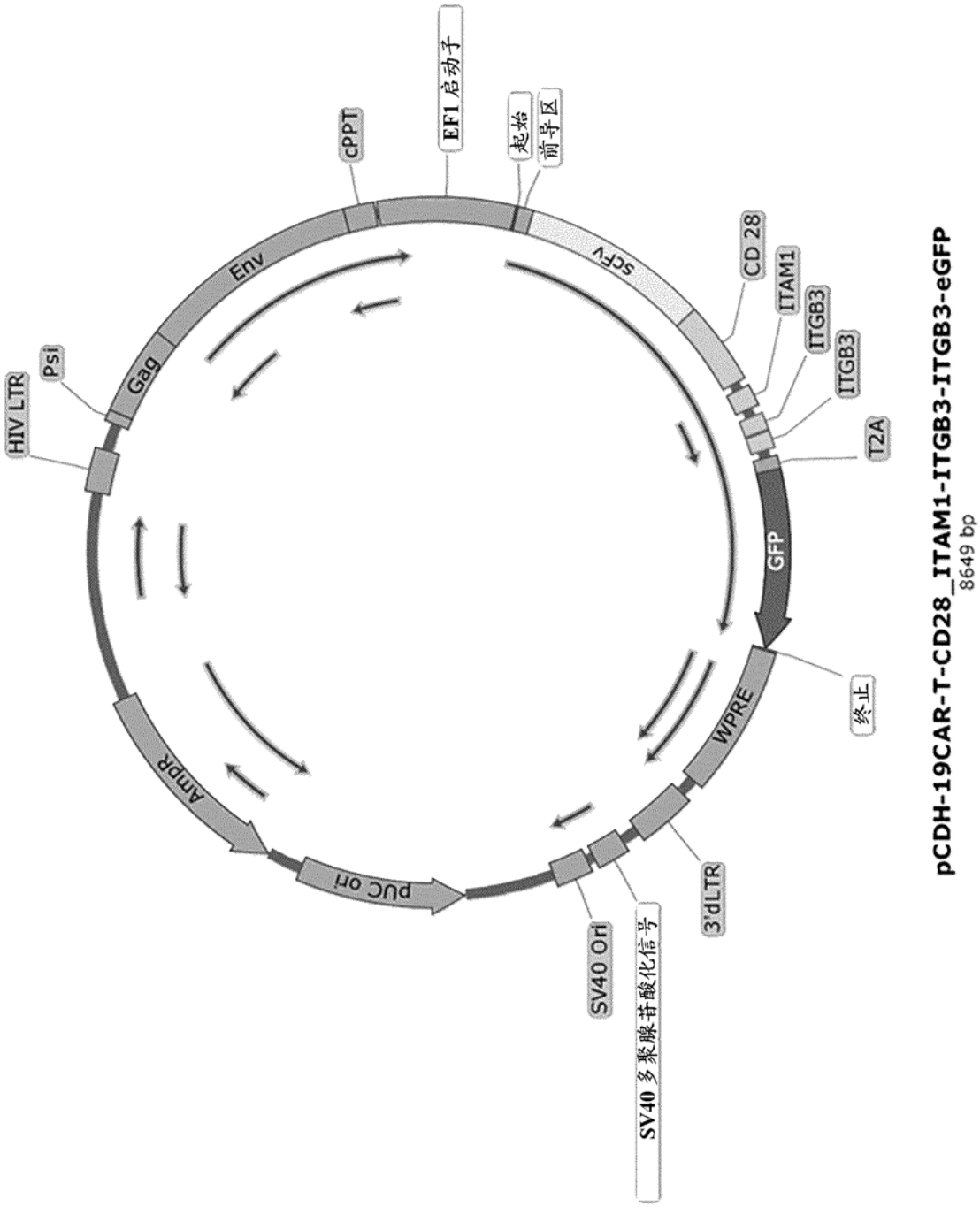

pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITGB3-eGFP
8649 bp
HIV LTR
Psi
Gag
Env
cPPT
EF1启动子
起始
前导区
scFv
CD 28
ITAM1
ITGB3
ITGB3
T2A
GFP
终止
WPRE
3'dLTR
SV40多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
pUC ori
AmpR

图 19

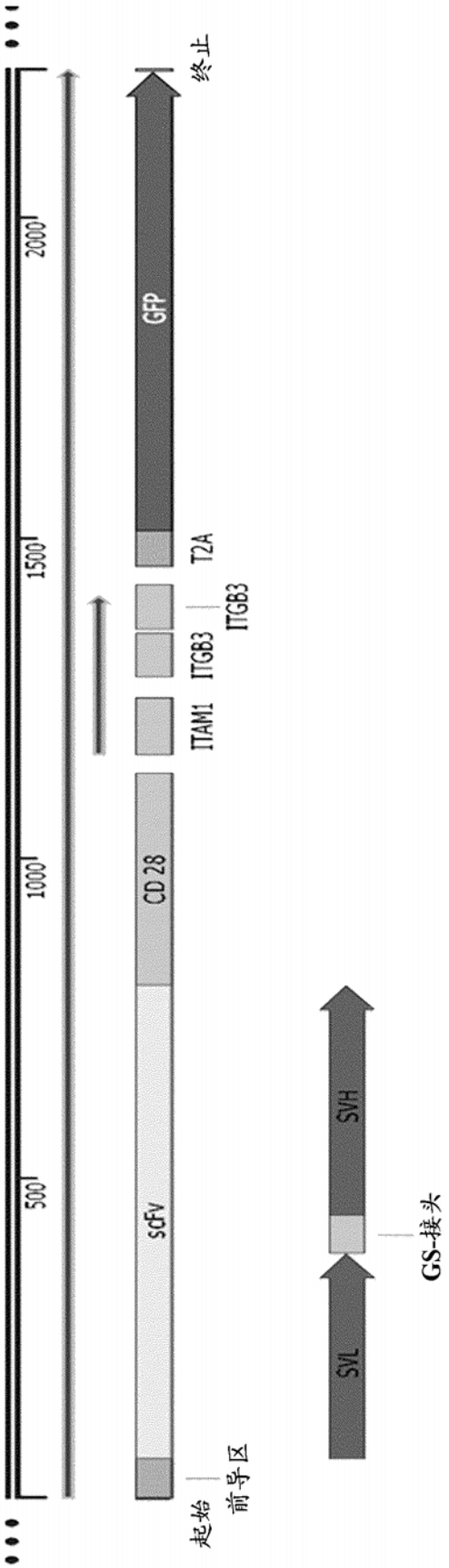

起始
前导区
scFv
CD 28
ITAM1
ITGB3
ITGB3
T2A
GFP
终止
500
1000
1500
2000
SVL
GS-接头
SVH

图 20

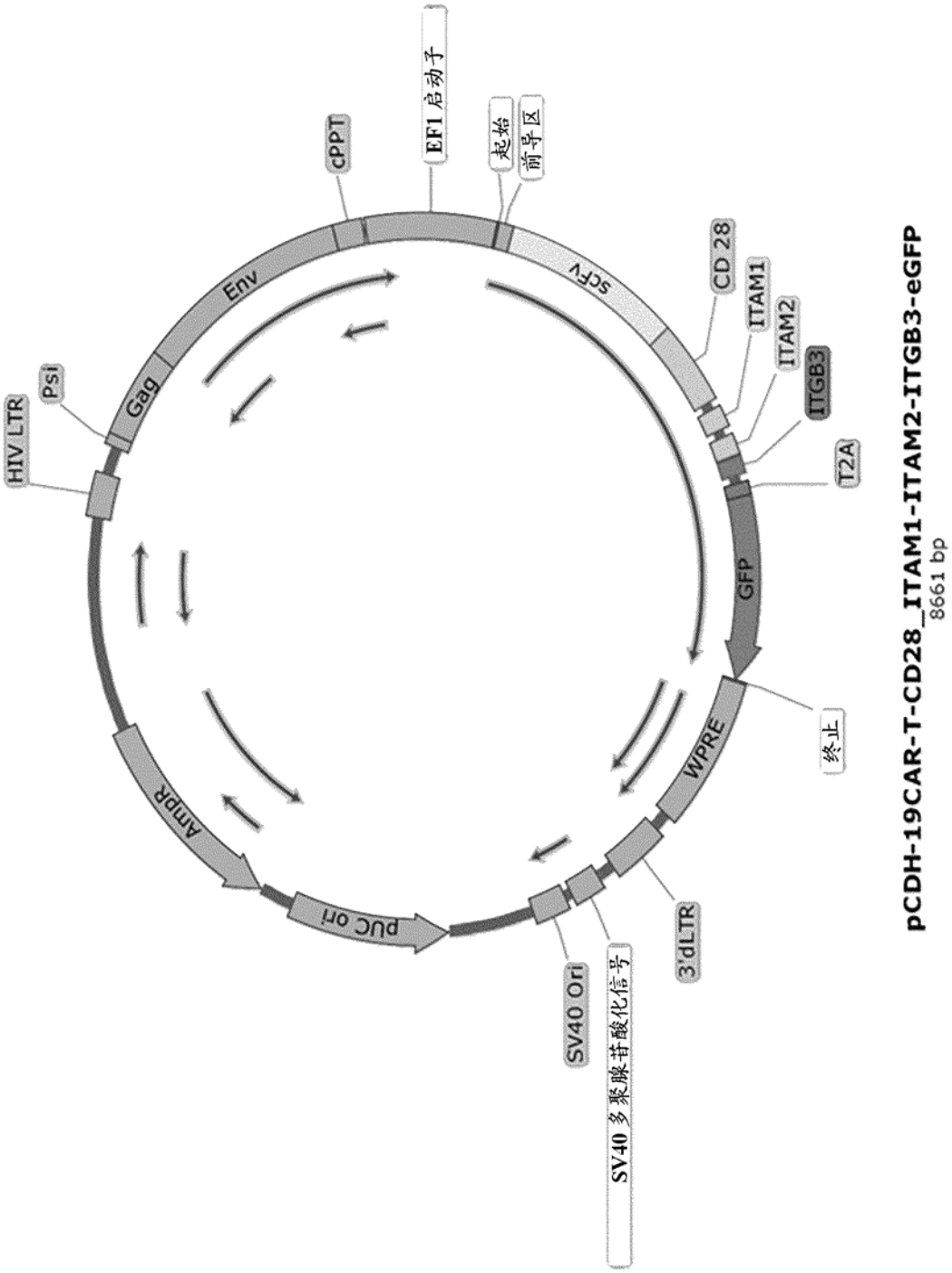

pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITAM2-ITGB3-eGFP
8661 bp
cPPT
EF1 启动子
起始
前导区
scFv
CD 28
ITAM1
ITAM2
ITGB3
T2A
GFP
终止
WPRE
3'dLTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
PUC ori
AmpR
HIV LTR
Psi
Gag
Env

图 21

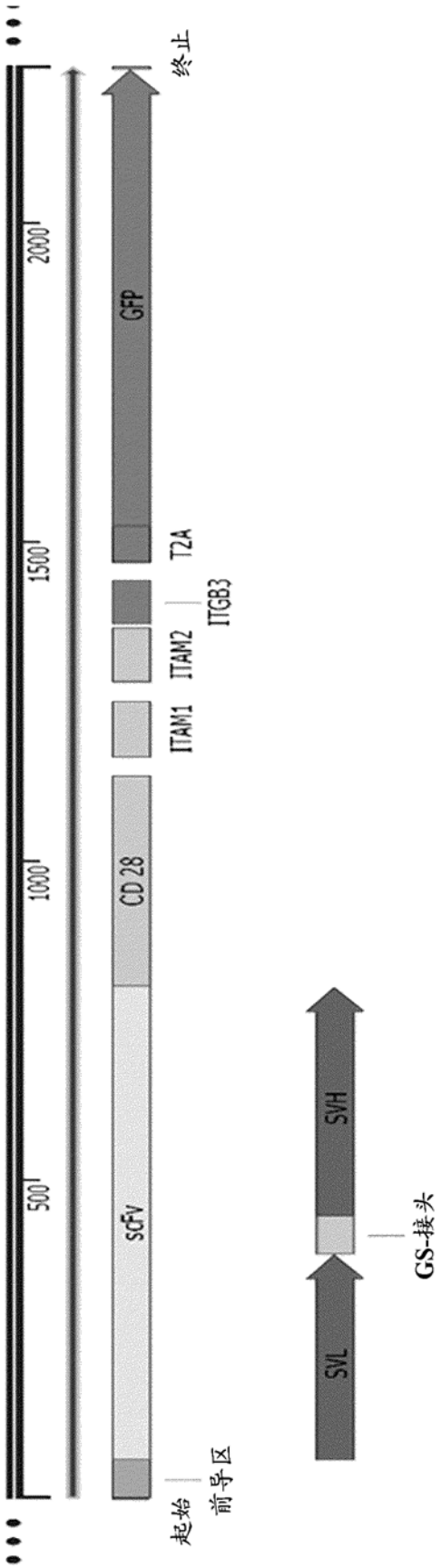

500
1000
1500
2000
起始
前导区
scFv
CD 28
ITAM1
ITAM2
ITGB3
T2A
GFP
终止
SVL
GS-接头
SVH

图 22

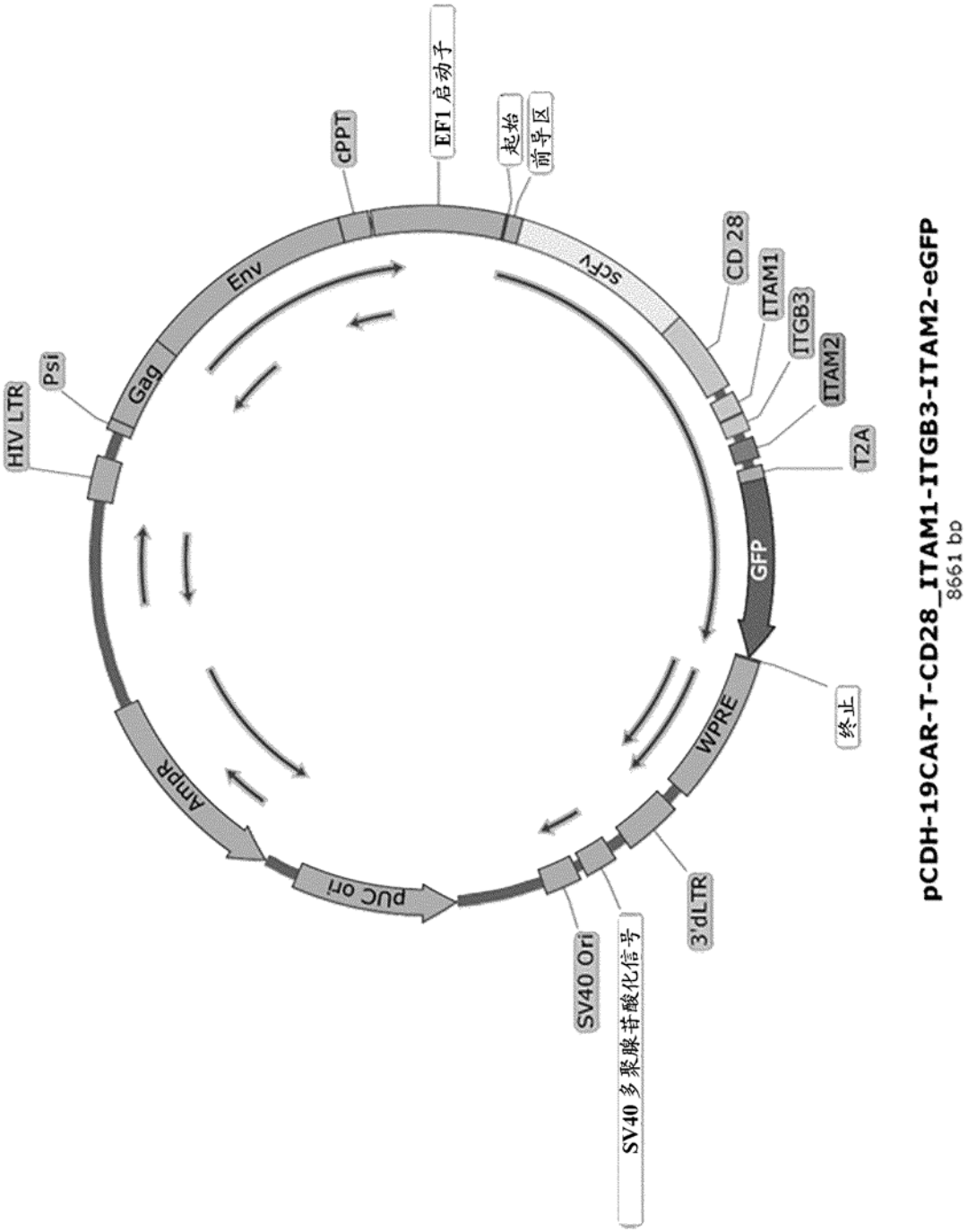

pCDH-19CAR-T-CD28_ITAM1-ITGB3-ITAM2-eGFP
8661 bp
HIV LTR
Psi
Gag
Env
cPPT
EF1 启动子
起始
前导区
scFv
CD 28
ITAM1
ITGB3
ITAM2
T2A
GFP
终止
WPRE
3'dLTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
PUC ori
AmpR

图 23

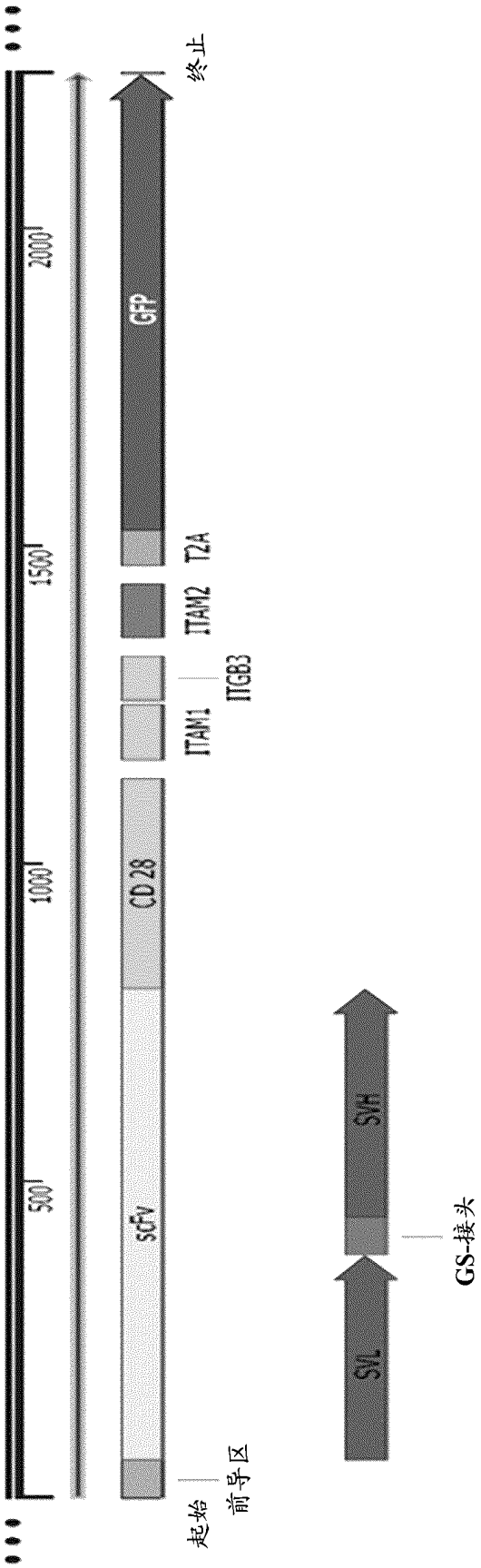

终止
GFP
2000
1500
1000
500
T2A
ITAM2
ITGB3
ITAM1
CD28
scFv
起始
前导区
SVH
GS-接头
SVL

图 24

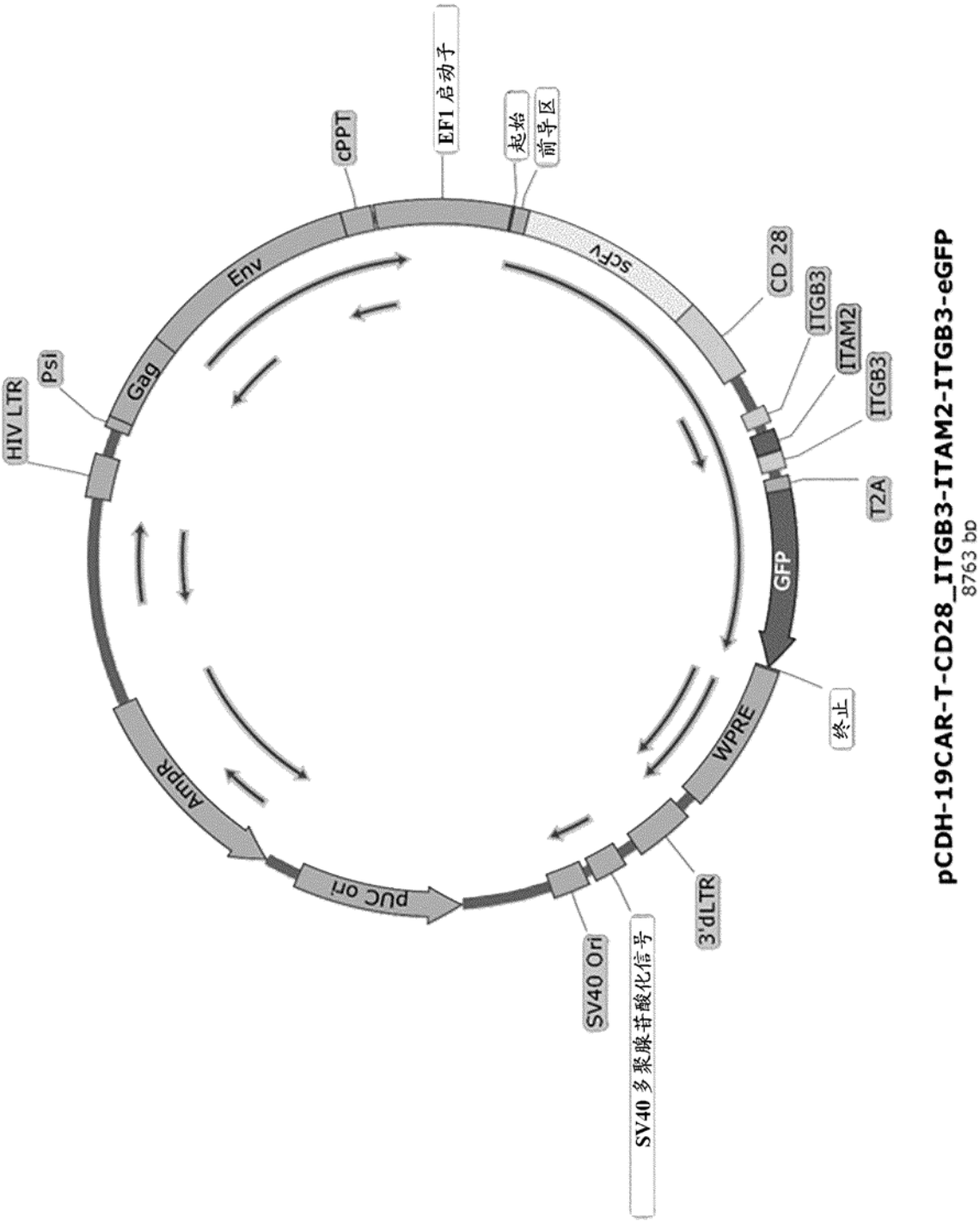

cPPT
EF1 启动子
起始
前导区
scFv
CD 28
ITGB3
ITAM2
ITGB3
T2A
GFP
终止
WPRE
3'dLTR
SV40 多聚腺苷酸化信号
SV40 Ori
pUC ori
AmpR
HIV LTR
Psi
Gag
Env
pCDH-19CAR-T-CD28_ITGB3-ITAM2-ITGB3-eGFP
8763 bp

图 25

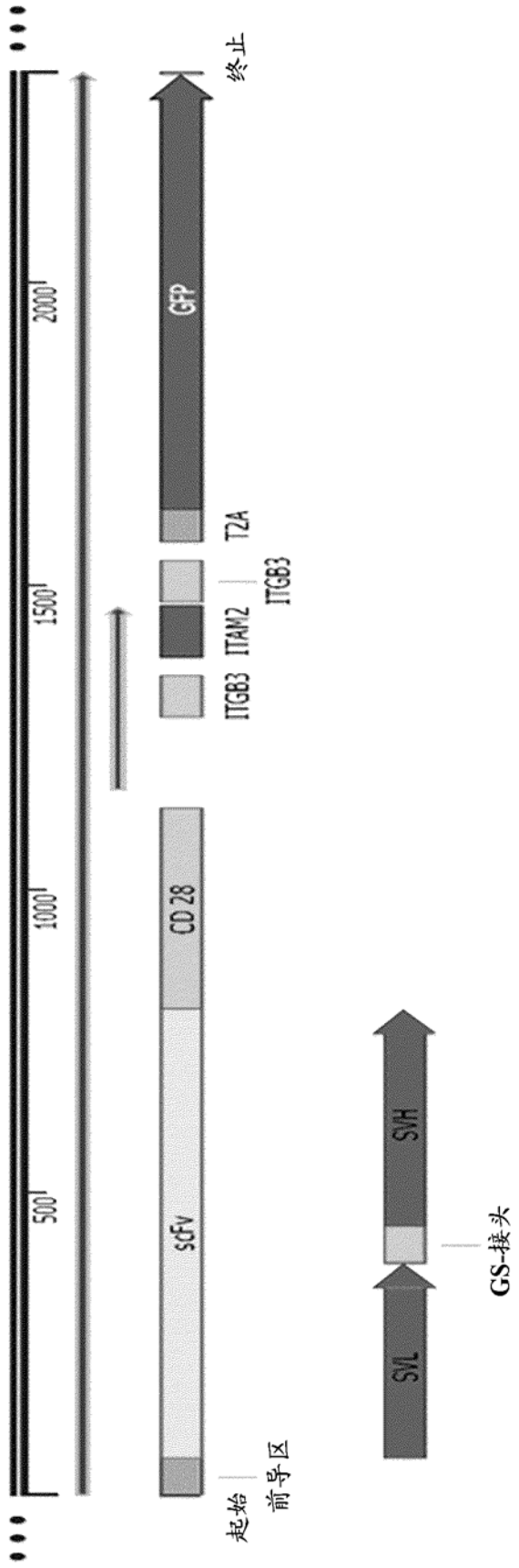

500
1000
1500
2000
起始
前导区
scFv
CD 28
ITGB3
ITAM2
ITGB3
T2A
GFP
终止
SVL
GS-接头
SVH

图 26

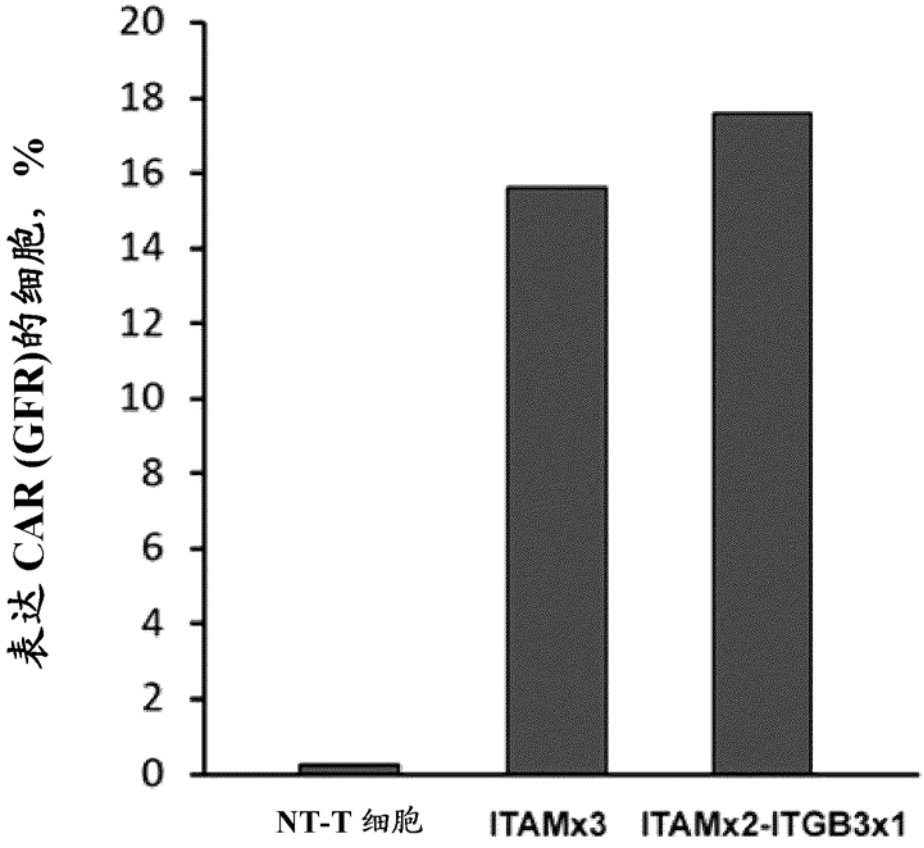

表达 CAR (GFR)的细胞，%
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
NT-T 细胞
ITAMx3
ITAMx2-ITGB3x1

图 27

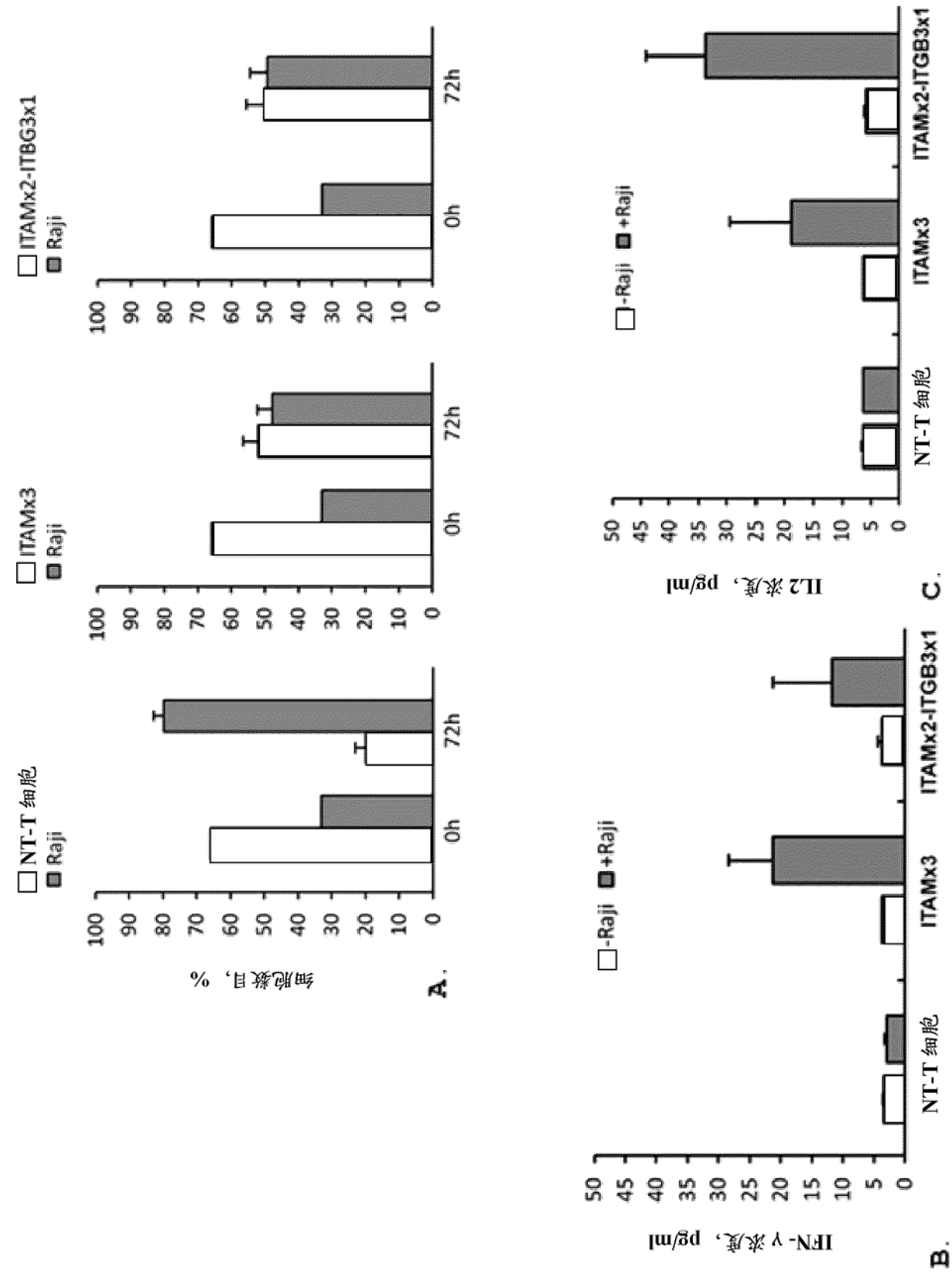

A.
细胞数目，%
NT-T 细胞
Raji
ITAMx3
ITAMx2-ITBG3x1
0h
72h
B.
IFN-γ 浓度，pg/ml
-Raji
+Raji
C.
IL2 浓度，pg/ml

图 28

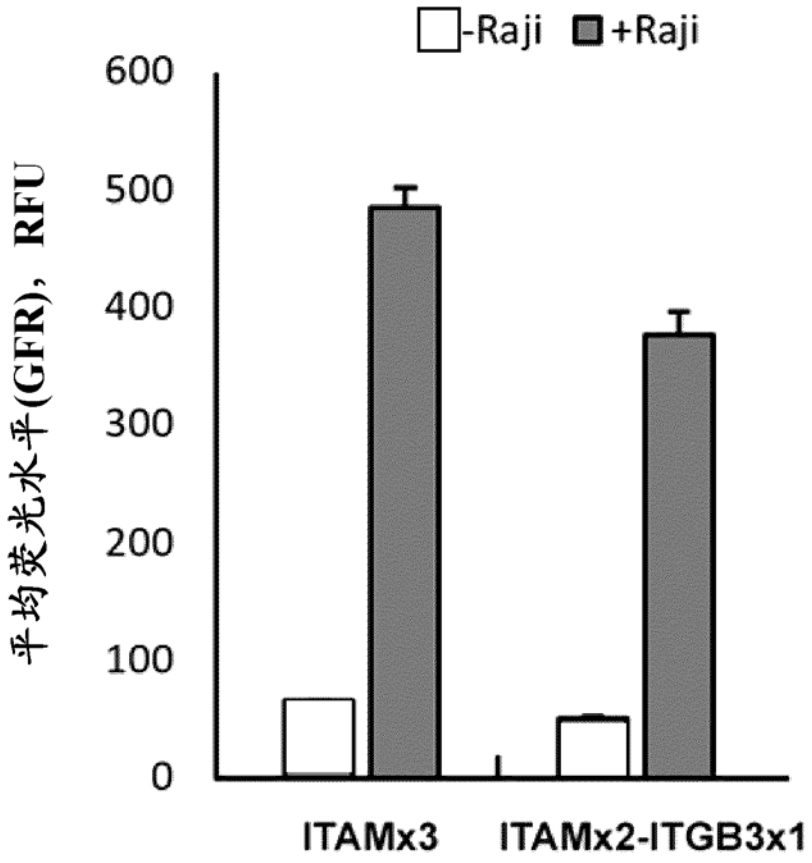

-Raji
+Raji
600
500
400
300
200
100
0
平均荧光水平(GFR)，RFU
ITAMx3
ITAMx2-ITGB3x1

图 29