



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108883170 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201680076271.2

詹姆斯·T·帕特森

(22)申请日 2016.10.24

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

(30)优先权数据

62/245,978 2015.10.23 US

62/382,691 2016.09.01 US

代理人 刘培培 王雯雯

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.25

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/058429 2016.10.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/070654 EN 2017.04.27

(71)申请人 索伦托治疗有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 贡纳·乔格·弗洛里斯·考夫曼

Y·福 张延良

权利要求书5页 说明书113页

序列表82页 附图21页

(54)发明名称

可程序化的通用细胞受体及其使用方法

(57)摘要

本发明提供可程序化的通用细胞受体(PUCRs),其包含催化性抗体区、跨膜域及细胞质域。本文所揭示的PUCR可偶联至特异性剂以使该受体针对任何所关注分子的特异性程序化。本发明也提供编码这样的PUCR的核酸及表达该PUCR的细胞。这种细胞可用于治疗多种医学病况及疾病,包括癌症及传染病。

1. 一种编码可程序化的通用细胞受体的经分离的核酸序列,其特征在于,所述可程序化的通用细胞受体包含:

- a. 催化性抗体或其催化性部分,包含反应性氨基酸残基;
- b. 跨膜域;及
- c. 细胞内域。

2. 如权利要求1所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性抗体或其催化性部分选自:醛缩酶催化性抗体、 β 内酰胺酶催化性抗体、酰胺酶催化性抗体、硫酯酶催化性抗体、及其催化性部分。

3. 如权利要求1或2所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性抗体或其催化性部分是醛缩酶催化性抗体或其催化性部分。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述反应性氨基酸残基选自:反应性半胱氨酸残基、反应性酪氨酸残基、反应性赖氨酸残基及反应性酪氨酸残基。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述反应性氨基酸残基是反应性赖氨酸残基。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性抗体或其催化性部分是人源化单克隆抗体38C2或其催化性部分。

7. 如权利要求1所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其催化性部分。

8. 如权利要求1所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性抗体或其催化性部分是人源化单克隆抗体33F12或其催化性部分。

9. 如权利要求1所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性抗体或其催化性部分是鼠类单克隆抗体38C2或33F12或其催化性部分。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性部分是单链可变片段(scFv)。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性部分是Fab片段。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述催化性部分选自:scFab、双价抗体、F(ab')₂片段、由VH及CH1域组成的Fd片段,及dAb片段。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述细胞内域包含信号传导域。

14. 如权利要求13所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述信号传导域是CD3- ζ 信号传导域。

15. 如权利要求13所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述信号传导域是CD28信号传导域。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述细胞内域包含共刺激信号传导域。

17. 如权利要求16所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述共刺激信号传导域包含选自下组的蛋白质的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相

关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体及其任何组合。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述跨膜域包含选自下组的蛋白质的跨膜域:T细胞受体的 α 链、T细胞受体的 β 链、T细胞受体的 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD8 α 、及其片段。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述可程序化的通用细胞受体进一步包含铰链区。

20. 如权利要求19所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述铰链区是CD8铰链区。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述可程序化的通用细胞受体进一步包含可检测部分。

22. 如权利要求21所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述可检测部分是多肽。

23. 如权利要求21所述的经分离的核酸序列,其特征在于,所述可检测部分选自:GST-标签、HIS-标签、myc-标签及HA-标签。

24. 一种编码可程序化的通用细胞受体的经分离的核酸序列,其特征在于,该可程序化的通用细胞受体包含如SEQ ID NO:10中所述的氨基酸序列。

25. 一种载体,其包含如权利要求1至24中任一项所述的核酸序列。

26. 如权利要求25所述的载体,其特征在于,所述载体是病毒载体。

27. 如权利要求26所述的载体,其特征在于,所述病毒载体选自:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体及腺相关病毒载体。

28. 一种经分离的宿主细胞,其包含如权利要求1至27中任一项所述的经分离的核酸。

29. 如权利要求28所述的宿主细胞,其特征在于,所述可程序化的通用细胞受体经由反应性部分偶联至特异性剂,其中所述反应性部分结合至所述催化性抗体或其催化性部分的反应性氨基酸残基。

30. 如权利要求29所述的宿主细胞,其特征在于,所述可程序化的通用细胞受体经由所述反应性部分共价结合至所述特异性剂。

31. 如权利要求29或30所述的宿主细胞,其特征在于,所述反应性部分选自:二酮、N-磺酰基- β -内酰胺及氮杂环丁酮。

32. 如权利要求29至31中任一项所述的宿主细胞,其特征在于,所述特异性剂包含反应性部分,该反应性部分经由连接体偶联。

33. 如权利要求28所述的宿主细胞,其特征在于,所述连接体选自:肽、小分子、烷基连接体及PEG连接体。

34. 如权利要求29至33中任一项所述的宿主细胞,其特征在于,所述特异性剂结合至癌症相关蛋白质。

35. 如权利要求34所述的宿主细胞,其特征在于,所述癌症相关蛋白质选自:CD19、整联蛋白、VEGFR2、PSMA、CEA、GM2、GD2、GD3、EGFR、EGFRvIII、HER2、IL13R及MUC-1。

36. 如权利要求29至34中任一项所述的宿主细胞,其特征在于,所述特异性剂结合至病毒蛋白。

37. 如权利要求36所述的宿主细胞,其特征在于,所述病毒蛋白是HIV蛋白、肝炎病毒蛋白、流行性感病毒蛋白、疱疹病毒蛋白、轮状病毒蛋白、呼吸道合胞病毒蛋白、脊髓灰质炎

病毒蛋白、鼻病毒蛋白、巨细胞病毒蛋白、猿猴免疫缺失病毒蛋白、脑炎病毒蛋白、水痘带状疱疹病毒蛋白及艾司坦-巴尔病毒蛋白。

38. 如权利要求29至34中任一项所述的宿主细胞,其特征在于,所述特异性剂结合至致病性生物体表达的蛋白质。

39. 如权利要求38所述的宿主细胞,其特征在于,所述致病性生物体是单细胞的。

40. 如权利要求38所述的宿主细胞,其特征在于,所述致病性生物体是多细胞的。

41. 如权利要求38所述的宿主细胞,其特征在于,所述致病性生物体选自:病毒、朊蛋白、细菌、真菌、原生动物及寄生虫。

42. 如权利要求29至41中任一项所述的宿主细胞,其特征在于,所述特异性剂包含结合蛋白、小分子、肽、肽模拟物、治疗剂、靶向剂、蛋白质激动剂、蛋白质拮抗剂、代谢调节剂、激素、毒素或生长因子。

43. 如权利要求42所述的宿主细胞,其特征在于,所述小分子是叶酸或DUPA。

44. 如权利要求42所述的宿主细胞,其特征在于,所述结合蛋白是抗体、抗体的抗原结合部分、配体、细胞因子或受体。

45. 如权利要求29至41中任一项所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞包含可程序化的通用细胞受体,其偶联至对第一抗原具有特异性的特异性剂,及可程序化的通用细胞受体,其偶联至与该第一抗原不同的第二抗原具有特异性的特异性剂。

46. 如权利要求29至45中任一项所述的宿主细胞,其特征在于,该宿主细胞是免疫细胞。

47. 如权利要求46所述的宿主细胞,其特征在于,所述免疫细胞选自:树突细胞、单核细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T细胞、B细胞、细胞毒性T淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、单核细胞及自然杀伤T (NKT) 细胞。

48. 如权利要求47所述的宿主细胞,其特征在于,所述NK细胞是NK-92细胞或经修饰的NK-92细胞。

49. 如权利要求48所述的宿主细胞,其特征在于,所述免疫细胞是经修饰的NK-92细胞(ATCC寄存号PTA-6672)。

50. 如权利要求46所述的宿主细胞,其是自患有癌症的人类个体分离。

51. 一种如权利要求29至50中任一项所述的宿主细胞群,其特征在于,该宿主细胞群包含:

a. 宿主细胞子群,其包含可程序化的通用细胞受体,该通用细胞受体连接至结合至第一抗原的特异性剂,及

b. 宿主细胞子群,其包含可程序化的通用细胞受体,该通用细胞受体连接至结合至第二抗原的特异性剂,该第二抗原不同于该第一抗原。

52. 一种在有需要的个体中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法,该方法包含向该个体施用如权利要求29至35或42至50中任一项所述的宿主细胞或如权利要求51所述的宿主细胞群,由此在该个体中治疗该癌症或抑制肿瘤生长。

53. 一种治疗有需要的个体中由致病性生物体引起的医学病况的方法,该方法包含向该个体施用如权利要求36至41中任一项所述的宿主细胞或如权利要求51所述的宿主细胞

群,由此治疗该个体中由该致病性生物体引起的该医学病况。

54.一种制造用于治疗有需要个体的癌症的定制化治疗性宿主细胞的方法,该方法包含:

使免疫细胞与特异性剂接触,该特异性剂结合至该免疫细胞的细胞膜上表达的可程序化的通用细胞受体,其中所述特异性剂结合至对应于该有需要个体的癌症抗原谱的癌症相关抗原。

55.如权利要求54所述的方法,其特征在于,所述免疫细胞选自:树突细胞、肥大细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、T细胞、B细胞、细胞毒性T淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞及自然杀伤T(NKT)细胞。

56.如权利要求54或55所述的方法,其特征在于,所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。

57.如权利要求55或56所述的方法,其特征在于,所述NK细胞是NK-92细胞或经修饰的NK-92细胞。

58.如权利要求57所述的方法,其特征在于,所述NK细胞是经修饰的NK-92细胞(ATCC寄存号PTA-6672)。

59.如权利要求54至58中任一项所述的方法,其特征在于,所述癌症相关抗原选自:CD19、整联蛋白、VEGFR2、PSMA、CEA、GM2、GD2、GD3、唾液酸(sialyl) Tn (STn)、EGFR、EGFRvIII、HER2、IL13R及MUC-1。

60.如权利要求54至58中任一项所述的方法,其特征在于,所述特异性剂包含结合蛋白、小分子、肽、肽模拟物、治疗剂、靶向剂、蛋白质激动剂、蛋白质拮抗剂、代谢调节剂、激素、毒素或生长因子。

61.如权利要求60所述的方法,其特征在于,该结合蛋白是抗体或其抗原结合片段。

62.如权利要求61所述的方法,其特征在于,该其抗原结合片段是scFv或Fab片段。

63.如权利要求61所述的方法,其特征在于,该抗体或其抗体结合片段包含可变κ轻链。

64.一种治疗有需要个体的癌症的方法,该方法包含:

(a)测定该个体的癌症抗原谱;

(b)选择结合至(a)中所鉴别的抗原的特异性剂;及

(c)施用免疫细胞,其包含可程序化的通用细胞受体结合(b)中所鉴别的该特异性剂,由此治疗该有需要个体的癌症。

65.一种试剂盒,其包含容器,该容器包含宿主细胞群,该宿主细胞群包含可程序化的通用细胞受体,

其中该可程序化的通用细胞受体包含

催化性抗体或其催化性部分,包含反应性氨基酸残基,其中该反应性氨基酸残基不结合至基质;

跨膜域;及

细胞内域。

66.如权利要求65所述的试剂盒,其特征在于,该宿主细胞是免疫细胞。

67.如权利要求66所述的试剂盒,其特征在于,该免疫细胞是经修饰的NK-92细胞(ATCC寄存号PTA-6672)。

68.如权利要求65至67中任一项所述的试剂盒,其进一步包含特异性剂。

69. 如权利要求65至68中任一项所述的试剂盒,其包含约 1×10^2 至约 1×10^{16} 个免疫细胞。

70. 一种试剂盒,其包含容器,该容器包含如权利要求1至24中任一项所述的核酸。

71. 一种试剂盒,其包含容器,该容器包含如权利要求25至27中任一项所述的载体。

可程序化的通用细胞受体及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求以下专利申请的优先权：2015年10月23日提交的、美国临时专利申请号为62/245,978的专利申请；2016年9月1日提交的、美国临时专利申请号为62/382,691的专利申请，其中每一篇的全部内容以引用方式明确地并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交的序列表，并且其全部内容以引用方式并入本文。该ASCII副本创建于2016年10月24日，名称为126591-00120_ST25.txt，大小为112千字节。

背景技术

[0005] 对诸如癌症及传染病等复杂疾病的有效治疗的手段有限是一全球性的健康问题。常规研发的用于治疗复杂疾病的医药药物及生物效应物分子通常由于高毒性而用途有限。举例而言，涉及化学疗法的癌症治疗通常是非特异性且导致不期望的副作用。

[0006] 在近期研发中，已研发出细胞基疗法，其利用患者的自身细胞（例如，免疫细胞）攻击患病细胞（例如，癌细胞）或致病性生物体。研发特异性细胞基疗法的尝试因技术上无法快速研发个人化细胞基疗法以靶向个体的特定患病细胞群或致病性生物体而受阻。该问题由于诸如癌症等复杂疾病的异质性抗原谱而进一步加重。

[0007] 因此，本领域需要可用于治疗复杂疾病的改良的定制化细胞基疗法。

发明内容

[0008] 本发明提供核酸、宿主细胞、其药物组合物、其试剂盒及使用本文所揭示的组合物的方法。

[0009] 一方面，本发明提供编码可程序化的通用细胞受体（在本文中也称为PUCR）的经分离的核酸序列，其中该可程序化的通用细胞受体包含含有反应性氨基酸残基的催化性抗体或其催化性部分；跨膜域；及细胞内域。

[0010] 在一些实施例中，催化性抗体或其催化性部分选自：醛缩酶催化性抗体、β内酰胺酶催化性抗体、酰胺酶催化性抗体、硫酯酶催化性抗体及其催化性部分。在一些实施例中，催化性抗体或其催化性部分是醛缩酶催化性抗体或其催化性部分。

[0011] 在一些实施例中，催化性抗体或其催化性部分的反应性氨基酸残基选自：反应性半胱氨酸残基、反应性酪氨酸残基、反应性赖氨酸残基及反应性酪氨酸残基。在一些实施例中，反应性氨基酸残基是反应性赖氨酸残基。

[0012] 在一些实施例中，催化性抗体或其催化性部分是人源化单克隆抗体38C2或其催化性部分。在一些实施例中，催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其催化性部分。在一些实施例中，催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或其催化性部分。在一些实施例中，催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施例中，催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。在

一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分是由SEQ ID NO:13的核酸序列编码。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分是由SEQ ID NO:14的核酸序列编码。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分是由SEQ ID NO:47的核酸序列编码。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分是人源化单克隆抗体33F12或其催化性部分。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分是鼠类单克隆抗体38C2或33F12或其催化性部分。

[0013] 在一些实施例中,催化性部分是单链可变片段(scFv)。在一些实施例中,催化性部分是Fab片段。在一些实施例中,催化性部分是scFab。在其他实施例中,催化性部分选自:scFab、双价抗体(diabody)、F(ab')₂片段、由VH及CH1域组成的Fd片段、及dAb片段。

[0014] 在一些实施例中,细胞内域包含信号传导域。在一些实施例中,信号传导域是CD3- ζ 信号传导域。在一些实施例中,CD3- ζ 信号传导域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3- ζ 信号传导域包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3- ζ 信号传导域是由SEQ ID NO:18的核酸序列编码。在一些实施例中,CD3- ζ 信号传导域是由SEQ ID NO:62的核酸序列编码。在其他实施例中,信号传导域是CD28信号传导域。在一些实施例中,CD28信号传导域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施例中,CD28信号传导域是由SEQ ID NO:17的核酸序列编码。

[0015] 在一些实施例中,细胞内域包含共刺激信号传导域。在一些实施例中,共刺激信号传导域包含选自下组的蛋白质的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体及其任何组合。

[0016] 在一些实施例中,跨膜域包含选自下组的蛋白质的跨膜域:T细胞受体的 α 链、T细胞受体的 β 链、T细胞受体的 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD8 α 及其片段。在一些实施例中,跨膜域是CD3- ζ 跨膜域。在一些实施例中,CD3- ζ 跨膜域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3- ζ 跨膜域是由SEQ ID NO:16的核酸序列编码。在一些实施例中,跨膜域是CD28跨膜域。在一些实施例中,CD28跨膜域包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施例中,CD28跨膜域是由SEQ ID NO:61的核酸序列编码。

[0017] 在甚至其他实施例中,可程序化的通用细胞受体进一步包含铰链区。在一些实施例中,铰链区是CD8铰链区。在一些实施例中,CD8铰链区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一些实施例中,铰链区是杂合CD8及CD28铰链区。在一些实施例中,铰链区包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在一些实施例中,铰链区包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列。在一些实施例中,铰链区包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在一些实施例中,铰链区包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:15的核酸序列编码。在一些实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:60的核酸序列编码。

[0018] 在一些实施例中,可程序化的通用细胞受体进一步包含可检测部分。在一些实施

例中,可检测部分是多肽。在一些实施例中,可检测部分选自:GST-标签、HIS-标签、myc-标签及HA-标签。在一些实施例中,myc-标签包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一些实施例中,myc-标签是由SEQ ID NO:12的核酸序列编码。在一些实施例中,myc-标签是由SEQ ID NO:39的核酸序列编码。

[0019] 一方面,本发明提供编码可程序化的通用细胞受体的经分离的核酸序列,其中该可程序化的通用细胞受体包含如SEQ ID NO:10中所述的氨基酸序列。本发明还提供编码可程序化的通用细胞受体的经分离的核酸序列,其中该可程序化的通用细胞受体包含如SEQ ID NO:9中所述的氨基酸序列。本发明还提供编码可程序化的通用细胞受体的经分离的核酸序列,其中该可程序化的通用细胞受体包含如SEQ ID NO:102中所述的氨基酸序列。本发明还提供编码可程序化的通用细胞受体的经分离的核酸序列,其中该可程序化的通用细胞受体包含如SEQ ID NO:103中所述的氨基酸序列。本发明还提供编码可程序化的通用细胞受体的经分离的核酸序列,其中该可程序化的通用细胞受体包含如SEQ ID NO:105中所述的氨基酸序列。本发明还提供编码可程序化的通用细胞受体的经分离的核酸序列,其中该可程序化的通用细胞受体包含如SEQ ID NO:45中所述的氨基酸序列。在一些实施例中,编码可程序化的通用细胞受体的核酸序列包含SEQ ID NO:19的核酸序列。在一些实施例中,编码可程序化的通用细胞受体的核酸序列包含SEQ ID NO:20的核酸序列。在一些实施例中,编码可程序化的通用细胞受体的核酸序列包含SEQ ID NO:48的核酸序列。在一些实施例中,编码可程序化的通用细胞受体的核酸序列包含SEQ ID NO:106的核酸序列。

[0020] 另一方面,本发明提供包含本文所揭示核酸序列的载体。在一些实施例中,载体是病毒载体。在一些实施例中,病毒载体选自:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体及腺相关病毒载体。在一些实施例中,病毒载体是基于鼠类白血病病毒(MLV)的逆转录病毒载体。在一些实施例中,病毒载体是基于莫罗尼(Moloney)鼠类白血病病毒(MoMuLV)的逆转录病毒载体。

[0021] 一方面,本发明提供包含本文所揭示经分离核酸的经分离的宿主细胞。

[0022] 在一些实施例中,本文提供的可程序化的通用细胞受体经由反应性部分偶联至特异性剂,其中该反应性部分结合至该催化性抗体或其催化性部分的反应性氨基酸残基。在一些实施例中,可程序化的通用细胞受体经由该反应性部分共价结合至该特异性剂。在一些实施例中,反应性部分选自:二酮、N-磺酰基- β -内酰胺及氮杂环丁酮。在一些实施例中,特异性剂包含经由连接体偶联的反应性部分。在甚至其他实施例中,连接体选自:肽、小分子、烷基连接体及PEG连接体。

[0023] 在一些实施例中,特异性剂结合至癌症相关蛋白质。在一些实施例中,癌症相关蛋白质选自:CD19、整联蛋白、VEGFR2、PSMA、CEA、GM2、GD2、GD3、EGFR、EGFRvIII、HER2、IL13R、叶酸盐受体及MUC-1。在一些实施例中,癌症相关蛋白质选自:胆囊收缩素B受体、促性腺激素释放激素受体、生长抑素受体2、胃泌素释放肽受体、神经激肽1受体、黑皮质素1受体、神经调压素受体、神经肽Y受体及C-型凝集素样分子1。在一些实施例中,特异性剂包含表4中列示的靶向分子。

[0024] 在其他实施例中,特异性剂结合至病毒蛋白。在一些实施例中,病毒蛋白选自:HIV蛋白、肝炎病毒蛋白、流行性感病毒蛋白、疱疹病毒蛋白、轮状病毒蛋白、呼吸道合胞病毒蛋白、脊髓灰质炎病毒蛋白、鼻病毒蛋白、巨细胞病毒蛋白、猿猴免疫缺失病毒蛋白、脑炎病

毒蛋白、水痘带状疱疹病毒蛋白及艾司坦-巴尔 (Epstein-Barr) 病毒蛋白。

[0025] 在一些实施例中,特异性剂结合至致病性生物体表达的蛋白质。在一些实施例中,致病性生物体是单细胞的。在其他实施例中,致病性生物体是多细胞的。在一些实施例中,致病性生物体选自:病毒、朊蛋白(prion)、细菌、真菌、原生动物及寄生虫。

[0026] 在一些实施例中,特异性剂包含结合蛋白、小分子、肽、肽模拟物、治疗剂、靶向剂、蛋白质激动剂、蛋白质拮抗剂、代谢调节剂、激素、毒素或生长因子。在一些实施例中,小分子是叶酸或DUPA。在一些实施例中,结合蛋白是抗体、抗体的抗原结合部分(例如,scFv)、配体、细胞因子或受体。在一些实施例中,结合蛋白是抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,抗原结合片段是scFv或Fab片段。在一些实施例中,抗原结合片段是单链Fab片段(scFab)。在一些实施例中,抗体或其抗体结合片段包含 κ 轻链(例如人源化 κ 轻链或人类 κ 轻链)。在一些实施例中,抗体或其抗体结合片段包含可变 κ 轻链(例如人源化可变 κ 轻链或人类可变 κ 轻链)。

[0027] 在一些实施例中,宿主细胞包含偶联至对第一抗原具有特异性的特异性剂的可程序化的通用细胞受体,及偶联至对与第一抗原不同的第二抗原具有特异性的特异性剂的可程序化的通用细胞受体。

[0028] 在一些实施例中,宿主细胞包含偶联至连接体的可程序化的通用细胞受体。

[0029] 在一些实施例中,宿主细胞是免疫细胞。在一些实施例中,免疫细胞选自:树突细胞、单核细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T细胞、B细胞、细胞毒性T淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞及自然杀伤T(NKT)细胞。在一些实施例中,NK细胞是NK-92细胞或经修饰的NK-92细胞。在一些实施例中,免疫细胞是经修饰的NK-92细胞(ATCC寄存号PTA-6672)。在一些实施例中,宿主细胞从患有癌症的人类个体分离。

[0030] 一方面,本发明提供宿主细胞群,其中该群包含:a)宿主细胞子群,其包含连接至结合至第一抗原的特异性剂的可程序化的通用细胞受体;及b)宿主细胞子群,其包含连接至结合至与第一抗原不同的第二抗原的特异性剂的可程序化的通用细胞受体。

[0031] 一方面,本发明提供在有需要的个体中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法,该方法包含向该个体施用本文所揭示的宿主细胞或宿主细胞群,由此在该个体中治疗该癌症或抑制肿瘤生长。在一些实施例中,本发明提供治疗与VEGFR2相关的癌症的方法。在一些实施例中,本发明提供治疗与PSMA相关的癌症(例如前列腺癌)的方法。在一些实施例中,本发明提供治疗与CD19相关的癌症(例如急性淋巴母细胞性淋巴瘤(ALL)、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、肺癌及慢性淋巴细胞性白血病(CLL))的方法。在一些实施例中,本发明提供治疗与HER2相关的癌症(例如,卵巢癌、胃癌、子宫癌及乳腺癌)的方法。在一些实施例中,本发明提供治疗与EGFR相关的癌症(例如非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠癌、直肠癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、乳腺癌及胰腺癌)的方法。在一些实施例中,本发明提供治疗与IL13R相关的癌症(例如乳腺癌或恶性神经胶质瘤)的方法。

[0032] 另一方面,本发明提供治疗有需要的个体的由致病性生物体引起的医学病况的方法,该方法包含向该个体施用本文所揭示的宿主细胞或宿主细胞群,由此治疗该个体的由该致病性生物体引起的该医学病况。

[0033] 一方面,本发明提供制造用于治疗有需要的个体的癌症的定制化治疗性宿主细胞的方法,该方法包含使免疫细胞与特异性剂接触,该特异性剂结合至在该免疫细胞的细胞

膜上表达的可程序化的通用细胞受体,其中该特异性剂结合至对应于有需要的个体的癌症抗原谱(profile)的癌症相关抗原。在一些实施例中,免疫细胞选自:树突细胞、肥大细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、T细胞、B细胞、细胞毒性T淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞及自然杀伤T(NKT)细胞。在一些实施例中,免疫细胞是T细胞或NK细胞。在一些实施例中,NK细胞是NK-92细胞或经修饰的NK-92细胞。在一些实施例中,NK细胞是经修饰的NK-92细胞(ATCC寄存号PTA-6672)。在一些实施例中,癌症相关抗原选自:CD19、整联蛋白、VEGFR2、PSMA、CEA、GM2、GD2、GD3、唾液酸Tn(STn)、EGFR、EGFRvIII、HER2、IL13R、叶酸盐受体及MUC-1。在一些实施例中,癌症相关蛋白质选自:胆囊收缩素B受体、促性腺激素释放激素受体、生长抑素受体2、胃泌素释放肽受体、神经激肽1受体、黑皮质素1受体、神经调压素受体、神经肽Y受体及C-型凝集素样分子1。在其他实施例中,特异性剂包含结合蛋白、小分子、肽、肽模拟物、治疗剂、靶向剂、蛋白质激动剂、蛋白质拮抗剂、代谢调节剂、激素、毒素或生长因子。

[0034] 一方面,本发明提供治疗有需要的个体的癌症的方法,该方法包含测定该个体的癌症抗原谱;选择结合至先前于癌症抗原谱中鉴别的抗原的特异性剂;及施用免疫细胞,该免疫细胞包含结合至先前鉴别的特异性剂的可程序化的通用细胞受体。

[0035] 一方面,本发明提供试剂盒,其包含容器,该容器包含宿主细胞群,该宿主细胞群包含可程序化的通用细胞受体,其中该可程序化的通用细胞受体包含含有反应性氨基酸残基的催化性抗体或其催化性部分;其中该反应性氨基酸残基不结合至基质;跨膜域;及细胞内域。在一些实施例中,宿主细胞是免疫细胞。在一些实施例中,免疫细胞是经修饰的NK-92细胞(ATCC寄存号PTA-6672)。在一些实施例中,试剂盒进一步包含特异性剂。在一些实施例中,试剂盒包含约 1×10^2 至约 1×10^{16} 个免疫细胞。

[0036] 另一方面,本发明提供试剂盒,其包含容器,该容器包含本文所揭示核酸。

[0037] 另一方面,本发明提供试剂盒,其包含容器,该容器包含本文所揭示载体。

附图说明

[0038] 图1描绘了对宿主细胞(例如,NK细胞或T细胞)进行程序化的示意图,该宿主细胞包含偶联至特异性剂的可程序化的通用细胞受体。

[0039] 图2描绘了小分子位点特异性偶联至催化性抗体h38C2(人源化38C2)的可变域中的反应性Lys93残基上的示意性反应。该赖氨酸残基定位于抗体的疏水核心中。Lys93的侧链NH₂基团在生理条件下保持未质子化,其中其可攻击反应性部分以形成共价键。

[0040] 图3描绘了在非还原条件及还原条件二者下对人源化及鼠类38C2scFv-Fc的纯化的SDS-PAGE分析。

[0041] 图4描绘了对人源化38C2 scFv-Fc与氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯的反应性的质谱分析。

[0042] 图5描绘了对鼠类38c2 scFv-Fc与氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯的反应性的质谱分析。

[0043] 图6描绘了偶联至氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯的人源化38C2 scFv-Fc的肽图谱分析数据。显示肽片段的质量含有人源化38C2 scFv-Fc的Lys93,表示在重链的Lys 93上发生偶联反应。

[0044] 图7描绘了示例性特异性剂叶酸-二酮(2-[4-[2-氨基-4-氧代-3H-蝶啶-6-基)甲基氨基]苯甲酰基]氨基]-5-[2-[2-[2-[5-[4-(3,5-二氧代己基)苯氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-5-氧代-戊酸)的化学结构。

[0045] 图8描绘了示例性特异性剂叶酸-氮杂环丁酮(2-[4-[2-氨基-4-氧代-3H-蝶啶-6-基)甲基氨基]苯甲酰基]氨基]-5-氧代-5-[2-[2-[3-氧代-3-[4-[3-氧代-3-(2-氧代氮杂环丁-1-基)丙基]苯氨基]丙氧基]乙氧基]乙基氨基]戊酸)的化学结构。

[0046] 图9描绘了示例性特异性剂二酮-PEG5-DUPA((2S)-2-[[[(1S)-4-[8-[[[(1S)-1-苄基-2-[[[(1S)-1-苄基-2-[2-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-[4-(3,5-二氧代己基)苯氨基]-3-氧代-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰基氨基]乙氧基]乙基氨基]-2-氧代-乙基]氨基]-2-氧代-乙基]氨基]-8-氧代-辛基]氨基]-1-羧基-4-氧代-丁基]胺甲酰基氨基]戊二酸)的化学结构。

[0047] 图10描绘了示例性特异性剂DUPA-氮杂环丁酮((2S)-2-[[[(1S)-4-[8-[[[(1S)-1-苄基-2-[[[(1S)-1-苄基-2-氧代-2-[2-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-氧代-3-[4-[3-氧代-3-(2-氧代氮杂环丁-1-基)丙基]苯氨基]丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰基氨基]乙氧基]乙基氨基]乙基]氨基]-2-氧代-乙基]氨基]-8-氧代-辛基]氨基]-1-羧基-4-氧代-丁基]胺甲酰基氨基]戊二酸)的化学结构。

[0048] 图11描绘了示例性特异性剂氮杂环丁酮-PEG8-生物素(5-[3aS,4S,6aR)-2-氧代-1,3,3a,4,6,6a-六氢噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-[2-[3-氧代-3-[4-[3-氧代-3-(2-氧代氮杂环丁-1-基)丙基]苯氨基]丙氧基]乙氧基]丙酰基氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]戊酰胺)的化学结构。

[0049] 图12描绘了野生型NKL细胞(“-PUCR”;中间列)或表达包含38C2scFab的PUCR的NKL细胞(“+PUCR”;下列)的流式细胞测量术数据,这些细胞与1 μ M或10 μ M特异性剂AZD-PEG8-生物素反应。使用DTAF偶联的链霉亲和素检测AZD-PEG8-生物素与PUCR的偶联且通过FACS进行分析。背景荧光对照显示于上列左图中。经DTAF偶联的链霉亲和素暴露的细胞(第二对照)显示于上列右图中。

[0050] 图13描绘了野生型NKL细胞(“-PUCR”)或表达包含38C2 scFab的PUCR的NKL细胞(“+PUCR”)的流式细胞测量术数据,这些细胞与1 μ M或10 μ M特异性剂AZD-PEG8-生物素反应。使用1 μ M DTAF偶联的链霉亲和素(“DTAF-链霉亲和素”)检测AZD-PEG8-生物素与PUCR的偶联且通过FACS进行分析。减去背景荧光。

[0051] 图14显示偶联反应的非还原SDS-PAGE分析的荧光检测影像以对具有偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的抗VEGFR2 VK-B8 Fab片段的重组体38C2 scFv-Fc进行程序化。左图显示未染色凝胶的荧光影像。将偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的抗VEGFR2 VK-B8 Fab片段用AlexaFluor® 488NHS酯荧光标记(“VKB8 Fab AZD 488”)。作为对照,使用未偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的抗VEGFR2 VKB8 Fab片段,其经AlexaFluor® 488NHS酯荧光标记(“VKB8 Fab 488”)或未经荧光标记(“VKB8 Fab”)。使偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的经荧光标记的抗VEGFR2 VKB8 Fab片段或未偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的经荧光标记的抗VEGFR2 VKB8 Fab片段与鼠类催化性38C2 scFv-Fc反应。在凝胶上运行,使用鼠类催化性38C2 scFv-Fc未检测到荧光(“m38C2”)。偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的抗VEGFR2 VKB8 Fab片段与鼠类催化性38C2 scFv-Fc的反应(“VKB8 Fab AZD 488+m38C2”)的结果为

检测到VK-B8 Fab片段偶联的38C2 scFv的荧光高分子量复合物(用“*”表示)。相比之下,使用未偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的抗VEGFR2 VKB8 Fab片段(“VKB8 Fab 488+m38C2”)未观察到荧光高分子量复合物。右图显示遵循Sypro[®] Ruby蛋白质染色以检测凝胶负荷的相同凝胶。

[0052] 图15显示重组体PSMA的结合曲线,该重组体PSMA结合至野生型KHYG-1自然杀伤细胞(“KHYG-1”;圆形)或经0.1nM、1nM、10nM或100nM DK-PEG5-DUPA程序化的表达包含38C2 scFab的PUCR的KHYG-1自然杀伤细胞(“KHYG-1/Fab38C2”;正方形)。

[0053] 图16A显示野生型KHYG-1NK细胞(“KHYG-1”;圆形)或经3.2nM、10nM、32nM、100nM、320nM或1000nM DK-PEG5-DUPA程序化的表达包含38C2 scFab的PUCR的KHYG-1 NK细胞(“KHYG-1/Fab38C2”;正方形)对PSMA阳性LNCaP细胞的细胞毒性(杀死%)。

[0054] 图16B显示野生型KHYG-1NK细胞(“KHYG-1”;圆形)或经3.2nM、10nM、32nM、100nM、320nM或1000nM DK-PEG5-DUPA程序化的表达包含38C2 scFab的PUCR的KHYG-1 NK细胞(“KHYG-1/Fab38C2”;正方形)对PSMA阴性PC-3细胞的细胞毒性(杀死%)。

[0055] 图17描绘了示例性连接体二酮-PEG5-PFP酯(3-[2-[2-[2-[2-[3-[4-(3,5-二氧代己基)苯氨基]-3-氧代-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸(2,3,4,5,6-五氟苯基)酯)的化学结构。

[0056] 图18A描绘了抗PSMA克隆A11 Fab片段的质谱分析。

[0057] 图18B描绘了抗PSMA克隆A11 Fab片段与二酮-PEG5-PFP酯连接体的反应所得产物的质谱分析。

[0058] 图19描绘了示例性连接体氮杂环丁酮-PEG13-PFP(3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-氧代-3-[4-[3-氧代-3-(2-氧代氮杂环丁-1-基)丙基]苯氨基]丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸(2,3,4,5,6-五氟苯基)酯)的化学结构。

具体实施方式

[0059] 相关申请案

[0060] I. 定义

[0061] 为了可更容易地理解本揭示内容,首先定义某些术语。这样的定义应根据本揭示内容的其余部分来阅读且如本领域技术人员所理解。除非另有定义,否则本文所用的所有技术及科学术语皆具有与本领域技术人员通常所理解相同的含义。在通篇详细说明中阐述其他定义。

[0062] 术语“高表达程度”或“高程度表达”在本文中可互换使用,是指相对于正常程度(即未患癌症的健康个体的程度)增加的分子标记物(例如,蛋白质及/或RNA(例如,mRNA))。在一些优选实施例中,高表达程度是指与个体的癌症相关的程度。

[0063] 术语“可程序化的通用细胞受体”或“PUCR”在本文中可互换使用,是指重组体分子,其含有包含催化性抗体或其催化性部分的细胞外域(在本文中也称为催化性抗体区)、跨膜域及细胞内域。在一些实施例中,可程序化的通用细胞受体是由已针对表达该受体的特定宿主细胞经密码子优化的核酸分子编码。

[0064] 如本文所用术语“抗体”是指由4条多肽链(两条重(H)链及两条轻(L)链)组成的任

何免疫球蛋白(Ig)分子或其任何功能片段、突变体、变体或衍生物。这样的突变体、变体或衍生物抗体形式为本领域已知。在全长抗体中,每一重链由重链可变区(本文中缩写为HCVR或VH)及重链恒定区组成。重链恒定区由3个域组成:CH1、CH2及CH3。每一轻链由轻链可变区(本文中缩写为LCVR或VL)及轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个域CL组成。可将VH及VL区进一步细分为称为互补决定区(CDR)的超变区,其夹杂有称为框架区(FR)的更保守区域。每一VH及VL由3个CDR及4个FR组成,其自氨基末端至羧基末端按下列顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可为任一类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)及种类(例如IgG1、IgG2、IgG 3、IgG4、IgA1及IgA2)或亚类。在一些实施例中,抗体是全长抗体。在一些实施例中,抗体是鼠类抗体。在一些实施例中,抗体是人类抗体。在一些实施例中,抗体是人源化抗体。在其他实施例中,抗体是嵌合抗体。嵌合及人源化抗体可通过本领域技术人员熟知的方法来制备,包括CDR移植法(例如,参见美国专利第5,843,708号、第6,180,370号、第5,693,762号、第5,585,089号及第5,530,101号)、链改组策略(例如,参见美国专利第5,565,332号;Rader等人(1998)PROC.NAT'L.ACAD.SCI.USA 95:8910-8915)、分子建模策略(美国专利第5,639,641号)及诸如此类。在一些实施例中,抗体是驴抗体。在一些实施例中,抗体是大鼠抗体。在一些实施例中,抗体是马抗体。在一些实施例中,抗体是骆驼抗体。在一些实施例中,抗体是鲨鱼抗体。

[0065] 如本文所用术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指抗体中保留特异性结合至抗原的能力的一个或多个片段。已显示,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来实施。这样的抗体实施例也可是双特异性、双重特异性或多特异性形式;特异性结合至两种或更多种不同抗原。术语抗体的“抗原结合部分”内所涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab片段,其是单价片段,由VL、VH、CL及CH1域组成;(ii) F(ab')₂片段,其是二价片段,包含两个在铰链区通过二硫桥连接的Fab片段;(iii) Fd片段,其由VH及CH1域组成;(iv) Fv片段,其由抗体单臂的VL及VH域组成,(v) dAb片段(Ward等人(1989)NATURE 341:544-546;及Winter等人,PCT公开案第W0 90/05144A1号,其内容是以引用方式并入本文中),其包含单一可变域;及(vi) 经分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个域VL及VH是由单独基因编码,但其可使用重组方法通过合成连接体接合,该合成连接体使得其能成为其中VL及VH区配对形成单价分子的单一蛋白质链(称为单链Fv(scFv));例如,参见Bird等人(1988)SCIENCE 242:423-426;及Huston等人(1988)PROC.NAT'L.ACAD.SCI.USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意欲涵盖于术语抗体的“抗原结合部分”内。也涵盖单链抗体的其他形式,例如双价抗体。术语抗体的抗原结合部分包括另外称为“scFab”的“单链Fab片段”。

[0066] “单链Fab片段”或“scFab”是多肽,该多肽包含抗体重链可变域(VH)、抗体恒定域1(CH1)、抗体轻链可变域(VL)、抗体轻链恒定域(CL)及连接体,其中该抗体域及该连接体在N末端至C末端方向上具有以下顺序中之一者:a) VH-CH1-连接体-VL-CL、b) VL-CL-连接体-VH-CH1、c) VH-CL-连接体-VL-CH1或d) VL-CH1-连接体-VH-CL;且其中该连接体是具有至少30个氨基酸、优选介于32个与50个氨基酸之间的多肽。所述单链Fab片段a) VH-CH1-连接体-VL-CL、b) VL-CL-连接体-VH-CH1、c) VH-CL-连接体-VL-CH1及d) VL-CH1-连接体-VH-CL可经由CL域与CH1域之间的天然二硫键稳定化。另外,这些单链Fab片段可经由插入半胱氨酸残基(例如,根据Kabat编号,可变重链中的位置44及可变轻链中的位置100)通过生成链间二硫键进一步稳定化。术语“N末端”表示N末端的最后一个氨基酸。术语“C末端”表示C末端的

最后一个氨基酸。

[0067] 如本文所用术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。重链及轻链的每一可变区中有3个CDR,对于每一可变区,这样的CDR命名为CDR1、CDR2及CDR3。如本文所用术语“CDR组”是指存在于能结合抗原的单一可变区中的一组3个CDR。已根据不同系统不同地定义这些CDR的确切边界。Kabat阐述的系统(Kabat等人,SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST(国立卫生研究院,Bethesda,Md.(1987)及(1991))不仅提供适用于抗体任一可变区的明确残基编号系统,且也提供界定3个CDR的精确残基边界。这些CDR可称为Kabat CDR。Chothia及同事发现,Kabat CDR内的某些子部分尽管在氨基酸序列层面具有显著差异,但采取几乎相同的肽主链构象(Chothia等人(1987)J.MOL.BIOL.196:901-917;及Chothia等人(1989)NATURE 342:877-883)。将这些子部分命名为L1、L2及L3或H1、H2及H3,其中“L”及“H”分别命名为轻链区及重链区。这样的区域可称为Chothia CDR,其具有与Kabat CDR重叠的边界。其他与Kabat CDR重叠的界定CDR的边界已阐述于以下文献中:Padlan等人(1995)FASEB J.9:133-139;及MacCallum等人(1996)J.MOL.BIOL.262(5):732-45。其他CDR边界定义可不严格遵循上述系统之一者,但仍将与Kabat CDR重叠,且其可根据如下预测或实验发现来缩短或延长:特定残基或残基群或甚至整个CDR不显著影响抗原结合。本文所用方法可利用根据这样的系统中之任一者界定的CDR,但优选实施例使用Kabat或Chothia界定的CDR。

[0068] 如本文所用术语“催化性抗体”是指能催化与反应性部分的生物化学反应的免疫球蛋白分子。催化性抗体可通过反应性免疫来产生,其中用反应性半抗原作为免疫原对动物进行免疫。催化性抗体可在任何动物中产生,包括但不限于小鼠、大鼠、牛、狗、绵羊、山羊、驴、马、人类、灵长类动物、猪及鸡。在一些实施例中,催化性抗体是全长抗体。在一些实施例中,催化性抗体是鼠类抗体。在一些实施例中,催化性抗体是人类抗体。在一些实施例中,催化性抗体是人源化抗体。在一些实施例中,催化性抗体是嵌合抗体。可根据本发明使用的多种催化性抗体及生成催化性抗体的方法是本领域已知的(例如,参见Zhu等人,(2004)J.MOL.BIOL.343:1269-80;Rader等人(1998)PROC.NAT'L.ACAD.SCI.USA 95:8910-8915;美国专利第6,210,938号、第6,368,839号、第6,326,176号、第6,589,766号;及第5,985,626号、第5,733,757号、第5,500,358号、第5,126,258号、第5,030,717号及第4,659,567号;其内容是以引用方式并入本文中,且具体而言,揭示内容是关于催化性抗体及生成催化性抗体的方法)。在一些实施例中,催化性抗体是醛缩酶抗体。在其他实施例中,催化性抗体是鼠类抗体38C2或该抗体的嵌合或人源化形式(例如,参见Karlstrom等人(2000)PROC.NAT'L.ACAD.SCI.USA 97(8):3878-3883;及Rader等人(2003)J.MOL.BIOL.332:889-99)。鼠类抗体38C2具有靠近HCDR3但在其外部的反应性赖氨酸,且是通过机械模拟天然醛缩酶的反应性免疫生成的催化性抗体(例如,参见Barbas等人(1997)SCIENCE 278:2085-2092)。在一些实施例中,催化性抗体是鼠类抗体33F12或该抗体的嵌合或人源化形式(例如,参见Goswami等人(2009)BIOORG.MED.CHEM.LETT.19(14):3821-4)。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤40F12产生的抗体(Zhu等人,(2004)J.MOL.BIOL.343:1269-80;Rader等人,(1998))或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤42F1产生的抗体(Zhu等人,(2004);Rader等人,(1998))或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤85A2(ATCC登录号PTA-1015)产生的抗体或该抗体的嵌合或人

源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤85C7(ATCC登录号PTA-1014)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤92F9(ATCC登录号PTA-1017)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤93F3(ATCC登录号PTA-823)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤84G3(ATCC登录号PTA-824)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤84G11(ATCC登录号PTA-1018)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤84H9(ATCC登录号PTA-1019)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤85H6(ATCC登录号PTA-825)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤90G8(ATCC登录号PTA-1016)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是 β 内酰胺酶抗体。在其他实施例中,催化性抗体是酯酶抗体。在一些实施例中,催化性抗体是酰胺酶抗体。在其他实施例中,催化性抗体是硫酯酶抗体。在一些实施例中,催化性抗体是驴抗体。在一些实施例中,催化性抗体是大鼠抗体。在一些实施例中,催化性抗体是马抗体。在一些实施例中,催化性抗体是骆驼抗体。在一些实施例中,催化性抗体是鲨鱼抗体。

[0069] 如本文所用术语“催化性部分”或“催化性片段”是指催化性抗体中保留催化与反应性部分的生物化学反应的能力的片段。在一些实施例中,催化性抗体的催化性部分保留反应性氨基酸残基,例如反应性赖氨酸残基,其使得氨基酸残基能催化生物化学反应。举例而言,醛缩酶抗体的催化性部分可包含反应性赖氨酸及使用天然醛缩酶的烯胺机制催化醛醇及/或逆醛醇反应所需的微环境。催化性抗体的催化性部分的各种形式涵盖于一些实施例中,只要该催化性部分保留反应性氨基酸残基即可。在一些实施例中,催化性部分是(i)催化性抗体的Fab片段,其是由VL、VH、CL及CH1域组成的单价片段;(ii)催化性抗体的F(ab')₂片段,其是包含两个在铰链区通过二硫桥连接的Fab片段的二价片段;(iii)催化性抗体的Fd片段,其是由VH及CH1域组成;(iv)催化性抗体的Fv片段,其是由催化性抗体的单臂的VL及VH域组成;(v)催化性抗体的dAb片段,其包含单一可变域;及(vi)催化性抗体的经分离的互补决定区(CDR)。在一些实施例中,催化性部分是来自催化性抗体(例如,本文所揭示的催化性抗体)的VH域的CDR3。在一些实施例中,催化性部分是单链Fab(scFab)。此外,尽管催化性抗体的Fv片段的两个域VL及VH是由单独基因编码,但其可使用重组方法通过合成连接体接合,该合成连接体使其能够成为其中VL及VH区配对形成单价分子的单一蛋白质链(称为单链Fv(scFv))。在一些实施例中,催化性抗体的催化性部分是scFv。在其他实施例中,催化性抗体的催化性部分是scFab。这样的单链抗体也意欲涵盖于术语催化性抗体的“催化性部分”内。也涵盖单链抗体的其他形式,例如双价抗体。

[0070] 如本文所用术语“反应性氨基酸残基”是指存于催化性抗体中的氨基酸残基,其可经由反应性侧链与反应性部分进行生物化学反应。反应性氨基酸残基可天然地存于催化性抗体中。或者,反应性氨基酸残基可通过故意使编码催化性抗体的DNA突变以编码所关注的特定反应性氨基酸残基来产生。在一个实施例中,反应性氨基酸残基或其反应性官能团(例如,亲核氨基或巯基)可附接至抗体的氨基酸残基也由此形成催化性抗体。在一些实施例中,反应性氨基酸残基是半胱氨酸(例如,硫酯酶抗体的反应性半胱氨酸残基)。在其他实施例中,反应性氨基酸残基是丝氨酸。在一些实施例中,反应性氨基酸残基是酪氨酸。在一些

实施例中,反应性氨基酸残基是赖氨酸(例如,醛缩酶抗体的反应性赖氨酸残基)。在其他实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的鼠类抗体38C2的重链上的Lys93。在其他实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的人源化抗体38C2的Lys93。在一些实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的鼠类抗体33F12的Lys93。在其他实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的人源化抗体33F12的Lys93。在一些实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的鼠类抗体40F12的Lys93。在其他实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的人源化抗体40F12的Lys93。在一些实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号鼠类抗体42F1的Lys93。在其他实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的人源化抗体42F1的Lys93。在一些实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的鼠类抗体84G3的Lys89。在其他实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的人源化抗体84G3的Lys89。在一些实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的鼠类抗体93F3的Lys89。在其他实施例中,反应性氨基酸残基是根据Kabat编号的人源化抗体93F3的Lys89。

[0071] 如本文所用术语“密码子优化”是指核酸分子的基因或编码区中的密码子经改变以反映宿主生物体的典型密码子使用且不改变该核酸分子(例如,DNA分子)编码的多肽。

[0072] 如本文在提及抗体(例如,催化性抗体)及其部分时使用的术语“人源化”是指非人类(例如,鼠类)抗体,其是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链、或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合子序列),其含有衍生自非人类免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体及其抗体片段大部分是人类免疫球蛋白(接受者抗体或抗体片段),其中来自接受者的互补决定区(CDR)的残基被来自诸如小鼠、大鼠或兔等非人类物种(供体抗体)的CDR且具有期望特异性、亲和性及能力的残基替代。在一些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基由相应非人类残基替代。此外,人源化抗体/抗体片段可包含在接受者抗体及导入的CDR或框架序列中皆未发现的残基。这样的修饰可进一步完善且优化抗体或抗体片的性能。通常,人源化抗体或其抗体片段将包含实质上所有的至少一个、且通常两个可变域,其中所有或实质上所有CDR区对应于非人类免疫球蛋白的CDR区,且FR区的所有或大部分为人类免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体或抗体片段也可包含免疫球蛋白恒定区(Fc)、通常人类免疫球蛋白恒定区的至少一部分。其他详情参见Jones等人(1986) NATURE 321:522-525;Reichmann等人(1988) NATURE 332:323-329;Presta(1992) CURR.OP. STRUCT. BIOL. 2:593-596。

[0073] 如本文所用术语“可检测部分”是指经由共价或非共价方式附接至可程序化通用嵌合受体及/或特异性剂的部分。在一些实施例中,可检测部分提供检测或量化包含可检测部分的可程序化通用嵌合受体及/或特异性剂的方式。在其他实施例中,可检测部分提供分离及/或纯化包含可检测部分的可程序化通用嵌合受体及/或特异性剂的方式。在一些实施例中,可检测部分包含多肽(例如,GST-标签、His-标签、myc-标签或HA-标签、荧光蛋白(例如,GFP或YFP))。在一些实施例中,可检测部分包含放射性部分、荧光部分、化学发光部分、质量标记、电荷标记或酶(例如,一种酶,对于其观察到该酶的基质转化活性可揭露可程序化通用嵌合受体及/或特异性剂的存在)。用于本发明中的可检测部分可附接至可程序化的通用细胞受体及/或特异性剂的任一部分。在一些实施例中,可检测部分附接至可程序化的通用细胞受体的N末端。在一些实施例中,可检测部分附接至特异性剂的N末端。在一些实施例中,可检测部分附接至可程序化的通用细胞受体的C末端。在一些实施例中,可检测部分

附接至特异性剂的C末端。在一些实施例中,可程序化的通用细胞受体及/或特异性剂包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个可检测部分。在一些实施例中,可检测部分可裂解。在其他实施例中,可检测部分不可裂解。在一些实施例中,可检测部分经由连接体附接至可程序化的通用细胞受体及/或特异性剂。在一些实施例中,连接体可裂解。在其他实施例中,连接体不可裂解。

[0074] 如本文所用术语“特异性剂”是指可结合(例如,共价或非共价偶联)至PUCR的催化性抗体区的分子。该特异性剂包含结合至存于PUCR的催化性抗体区中的反应性氨基酸残基的反应性部分。在结合至PUCR的催化性抗体区时,特异性剂赋予PUCR对靶分子的特异性。在一些实施例中,特异性剂包含结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)。在其他实施例中,特异性剂包含肽。在一些实施例中,特异性剂包含肽模拟物(例如,RGD肽模拟物)。在其他实施例中,特异性剂包含小分子(例如,叶酸或2-[3-(1,3-二羧基丙基)-脲基]戊二酸(DUPA))。在一些实施例中,特异性剂包含治疗剂。在其他实施例中,特异性剂包含靶向剂(例如,细胞靶向分子)。在一些实施例中,特异性剂包含蛋白质激动剂。在其他实施例中,特异性剂包含代谢调节剂。在一些实施例中,特异性剂包含激素。在其他实施例中,特异性剂包含毒素。在一些实施例中,特异性剂包含生长因子。在其他实施例中,特异性剂包含配体。在一些实施例中,特异性剂包含蛋白质。在其他实施例中,特异性剂包含类肽。在一些实施例中,特异性剂包含DNA适配体。在其他实施例中,特异性剂包含肽核酸。在一些实施例中,特异性剂包含维生素。在其他实施例中,特异性剂包含基质或基质类似物。在一些实施例中,特异性剂包含环状精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽(cRGD)。

[0075] 在一些实施例中,特异性剂包含连接体。在一些实施例中,连接体是柔性连接体。在一些实施例中,连接体是非柔性连接体。在一些实施例中,连接体可裂解。在一些实施例中,连接体可水解。在一些实施例中,连接体是不可裂解。在一些实施例中,连接体是聚乙二醇(PEG)连接体。

[0076] 在其他实施例中,特异性剂共价连接至PUCR的催化性抗体或其催化性部分。在一些实施例中,特异性剂非共价连接至PUCR的催化性抗体或其催化性部分。在其他实施例中,特异性剂与PUCR的催化性抗体或其催化性部分之间的共价键可逆。在一些实施例中,特异性剂与PUCR的催化性抗体或其催化性部分之间的共价键不可逆。在一些实施例中,特异性剂是叶酸-二酮分子(2-[[4-[(2-氨基-4-氧代-3H-蝶啶-6-基)甲基氨基]苯甲酰基]氨基]-5-[2-[2-[2-[5-[4-(3,5-二氧代己基)苯氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-5-氧代-戊酸)。在其他实施例中,特异性剂是叶酸-氮杂环丁酮分子(2-[[4-[(2-氨基-4-氧代-3H-蝶啶-6-基)甲基氨基]苯甲酰基]氨基]-5-氧代-5-[2-[2-[3-氧代-3-[4-[3-氧代-3-(2-氧代氮杂环丁-1-基)丙基]苯氨基]丙氧基]乙氧基]乙基氨基]戊酸)。在一些实施例中,特异性剂是DUPA-二酮分子((2S)-2-[[[(1S)-4-[[8-[[[(1S)-1-苄基-2-[[[(1S)-1-苄基-2-[2-[2-[3-[2-[2-[2-[3-[4-(3,5-二氧代己基)苯氨基]-3-氧代-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰基氨基]乙氧基]乙基氨基]-2-氧代-乙基]氨基]-2-氧代-乙基]氨基]-8-氧代-辛基]氨基]-1-羧基-4-氧代-丁基]胺甲酰基氨基]戊二酸;在本文中也称为DK-PEG5-DUPA及二酮-PEG5-DUPA)。在其他实施例中,特异性剂是DUPA-氮杂环丁酮分子((2S)-2-[[[(1S)-4-[[8-[[[(1S)-1-苄基-2-[[[(1S)-1-苄基-2-氧代-2-[2-[2-[3-[2-[2-[2-[2-[3-氧代-3-[4-[3-氧代-3-(2-氧代氮杂环丁-1-基)丙基]苯氨基]丙

氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰基氨基]乙氧基]乙基氨基]乙基]氨基]-2-氧代-乙基]氨基]-8-氧代-辛基]氨基]-1-羧基-4-氧代-丁基]胺甲酰基氨基]戊二酸)。在一些实施例中,特异性剂是AZD-PEG8-生物素(5-[(3aS,4S,6aR) -2-氧代-1,3,3a,4,6,6a-六氢噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基]-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-[2-[3-氧代-3-[4-[3-氧代-3-(2-氧代氮杂环丁-1-基)丙基]苯氨基]丙氧基]乙氧基]丙酰基氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]戊酰胺;在本文中也称为“AZD-PEG8-生物素”)。在一些实施例中,特异性剂氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯(在本文中也称为AZD-PEG5-甲基酯)。在一些实施例中,特异性剂是SCS-873(例如,参见Popkov等人(2009) PROC. NAT’ L. ACAD. SCI. USA 106 (11):4378-83)。在其他实施例中,特异性剂是cRGD-dk(例如,参见Popkov等人(2009))。

[0077] 如本文所用术语“结合蛋白”是指可特异性结合至靶分子的蛋白质或多肽。在一些实施例中,结合蛋白是抗体或其抗原结合片段,且靶分子是抗原。在一些实施例中,该抗原包含一种或多种转译后修饰。在一些实施例中,结合蛋白是特异性结合至靶分子(例如,蛋白质复合物结合配偶体)的蛋白质或多肽。在一些实施例中,结合蛋白是配体。在一些实施例中,结合蛋白是细胞因子。在一些实施例中,结合蛋白是受体。在一些实施例中,靶分子是抗原。在其他实施例中,靶分子是蛋白质。在一些实施例中,靶分子是肽。在一些实施例中,靶分子是蛋白质复合物。在一些实施例中,靶分子是脂质。在一些实施例中,靶分子是碳水化合物。在一些实施例中,靶分子是包含一种或多种转译后修饰的蛋白质。在一些实施例中,靶分子是细胞外基质组分。

[0078] 如本文所用术语“特异性结合”表示结合蛋白与靶分子形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合的特征可为平衡解离常数为至少约 1×10^6 M或更小(例如,较小平衡解离常数表示较紧密结合)。测定两个分子是否特异性结合的方法为本领域已知且包括例如平衡透析、表面等离子体共振等。

[0079] 如本文所用术语“反应性部分”是指能参与与PUCR的催化性抗体或其催化性部分的反应性氨基酸残基的反应的部分。在一些实施例中,反应性部分共价结合至反应性氨基酸残基。在一些实施例中,反应性部分共价结合至反应性氨基酸残基的侧链。在一些实施例中,反应性部分非共价结合至反应性氨基酸残基。在一些实施例中,反应性部分是选自以下的化学基团:酮、二酮、 β 内酰胺、活性酯卤代酮、内酯、酸酐、马来酰亚胺、环氧化物、醛脒、胍、亚胺、烯胺、磷酸酯、磷酸酯、环氧化物、氮丙啶、硫代环氧化物、经遮蔽或经保护二酮(例如,缩酮)、内酰胺、卤代酮、醛、及诸如此类。举例而言,在催化性抗体或其催化性部分是醛缩酶抗体或其催化性部分(例如,鼠类或人源化38C2)时,特异性剂可经由二酮或氮杂环丁酮反应性部分共价连接至反应性赖氨酸(例如,Lys93)。此外,在催化性抗体或其催化性部分是硫酯酶抗体或其催化性部分时,特异性剂可经由包含含马来酰亚胺组分或其他硫醇反应性基团(例如碘乙酰胺、芳基卤化物、二硫氢基及诸如此类)的反应性部分共价连接至反应性半胱氨酸。在一些实施例中,反应性部分是二酮。在其他实施例中,反应性部分是氮杂环丁酮。在一些实施例中,反应性部分是N-磺酰基- β -内酰胺。

[0080] 如本文所用术语“偶联官能团”是指存在于本文所述连接体上的能参与与存于特异性剂上的部分的反应的部分。在一些实施例中,偶联官能团能参与与存于特异性剂上的部分的点击化学反应(click-chemistry reaction)。在一些实施例中,偶联官能团包含正交官能团。在一些实施例中,偶联官能团能与存于特异性剂上的部分形成共价键。在一些实

施例中,偶联官能团能与存于特异性剂上的部分形成非共价键。

[0081] 如本文所用术语“宿主细胞”是指已以任何方式经修饰、转染、转变及/或操作以表达本文所揭示的可程序化的通用细胞受体的任何细胞。举例而言,在一些实施例中,宿主细胞已经修饰以包含编码本文所揭示的可程序化的通用细胞受体的外源多核苷酸(例如,载体、线性DNA分子、mRNA)。在一些实施例中,宿主细胞是真核细胞。在一些实施例中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施例中,宿主细胞是灵长类动物细胞。在一些实施例中,细胞是鼠类细胞。在一些实施例中,细胞是大鼠细胞。在一些实施例中,细胞是家畜细胞(例如,狗或猫细胞)。在一些实施例中,细胞是马细胞。在一些实施例中,细胞是牛细胞。在一些实施例中,细胞是非人灵长类动物细胞。在一些实施例中,细胞是人类细胞。在一些实施例中,宿主细胞是自个体分离。在一些实施例中,宿主细胞源自个体,其中将细胞自个体分离,如本文所述经修饰,且施用至获得该宿主细胞的同一个体。在一些实施例中,宿主细胞源自个体,其中将细胞自个体分离,如本文所述经修饰,且施用至与获得该宿主细胞者不同的个体。应理解,术语“宿主细胞”不仅旨在指特定个体细胞,且也指该细胞的后代。因为在后续世代中由于突变或环境影响可发生某些修饰,故该后代可实际上与亲代细胞不同,但仍包括在如本文所用术语“宿主细胞”的范围内。在一些实施例中,宿主细胞是免疫细胞。在一些实施例中,免疫细胞选自:树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T细胞(例如,调节性T细胞)、B细胞、细胞毒性T淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、单核细胞及自然杀伤T(NKT)细胞。在一些实施例中,宿主细胞是来自永生化细胞系的细胞。在一些实施例中,宿主细胞是来自自己确立细胞系的细胞。在一些实施例中,宿主细胞是T细胞。在一些实施例中,宿主细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施例中,宿主细胞是CD4⁺T细胞。在一些实施例中,细胞是NK细胞。在一些实施例中,细胞是NK-92细胞。在一些实施例中,宿主细胞是经修饰的NK-92细胞(例如,以ATCC寄号PTA-6672保存的经修饰的NK-92细胞;也阐述于例如美国专利第8,034,332号中)。在一些实施例中,宿主细胞是KHYG-1自然杀伤细胞(DSMZ登录号ACC 725;例如,参见Yagita等人(2000) LEUKEMIA 14(5):922-30)。在一些实施例中,宿主细胞是NKL自然杀伤细胞(例如,参见Robertson等人(1996) EXP. HEMATOL. 24(3):406-15)。在一些实施例中,宿主细胞是细胞毒性T淋巴细胞。

[0082] 如本文所用术语“核酸”或“多核苷酸”在本文中可互换使用,是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非明确限制,否则该术语涵盖含有已知天然核苷酸类似物的核酸,这样的类似物与参照核酸具有类似结合性质且以与天然核苷酸类似的方式代谢。除非另外指明,否则特定核酸序列也暗指涵盖其保守修饰变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP及互补序列以及明确指示的序列。具体而言,简并密码子取代可通过生成其中一个或多个所选(或全部)密码子的第三位经混合碱基及/或脱氧肌苷残基取代的序列来达成(Batzer等人(1991) NUCLEIC ACID RES. 19:5081; Ohtsuka等人(1985) J. BIOL. CHEM. 260:2605-2608;及Rossolini等人(1994) MOL. CELL. PROBES 8:91-98)。

[0083] 如本文所用术语“个体”包括人类及非人类动物。非人类动物包含所有脊椎动物(例如哺乳动物及非哺乳动物),例如小鼠、大鼠、兔、人类、非人灵长类动物、绵羊、马、狗、猫、牛、鸡、两栖动物及爬行动物。除非指出,否则术语“患者”或“个体”在本文中可互换使用。在特定实施例中,患有癌症(例如胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)或卵

巢癌)的个体是先前已诊断为患有癌症(例如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、NSCLC、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌及诸如此类)的个体。在其他实施例中,患有由致病性生物体(例如病毒、朊蛋白、细菌、真菌、原生动物或寄生虫)引起的医学病况的个体是先前已诊断为患有由致病性生物体(例如病毒、朊蛋白、细菌、真菌、原生动物或寄生虫)引起的医学病况的个体。在一些实施例中,医学病况是传染病。在一些实施例中,医学病况是HIV感染。在一些实施例中,医学病况是肝炎(例如,C型肝炎)。在一些实施例中,医学病况是疟疾。在一些实施例中,医学病况是梨形鞭毛虫症。

[0084] 如本文所用且除非另外规定,否则术语“约”或“大约”意指如本领域技术人员所确定的特定值的可接受误差,其部分取决于如何测量或测定该值。在某些实施例中,术语“约”或“大约”意指在1、2、3或4个标准偏差内。在某些实施例中,术语“约”或“大约”意指在给定值或范围的30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%内。

[0085] 如本文所用术语“经分离的”意指自天然状态改变或移除。举例而言,天然存在于活动物中的核酸或肽并非“经分离”,但部分或完全自其天然状态的共存材料分离的相同核酸或肽“经分离”。经分离的核酸或蛋白质可以实质上纯化形式存在,或可存在于非天然环境(例如宿主细胞)中。

[0086] 如本文所用术语“肽”、“多肽”及“蛋白质”可互换使用,且是指包括通过肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,且对构成蛋白质或肽序列的最大氨基酸数无限制。多肽包括包含两个或更多个通过肽键彼此接合的氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用术语“多肽”是指短链(本领域一般也称为例如肽、寡肽及寡聚物)及长链(本领域通常称为蛋白质)二者,其具有多种类型。“多肽”尤其也包括例如生物活性片段、实质上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、经修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0087] 如本文所用且除非另外规定,否则术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”及“治疗(treatment)”是指根除或改善疾病或病症(例如,癌症或由致病性生物体引起的疾病(例如,传染病))或与该疾病或病症相关的一种或多种症状。在某些实施例中,该术语是指通过向患有此疾病或病症的个体施用一种或多种预防性或治疗剂使疾病或病症(例如,癌症)的扩散或恶化降至最低。

[0088] 如本文所用术语“经转染”或“经转变”或“经转导”是指通过其将外源核酸转移至或引入宿主细胞中的过程。“经转染”或“经转变”或“经转导”的细胞是已经外源核酸转染、转变或转导的细胞。该细胞包括原代个体细胞及其后代。

[0089] 如本文所用且除非另外规定,否则术语“癌症”及“癌性”是指或阐述哺乳动物中通常特征为细胞生长失调的生理病况。癌症的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌及诸如此类。

[0090] II. 本发明的组合物

[0091] 本文中提供用于使用可程序化的通用细胞受体(PUCR)治疗疾病、例如癌症或传染病的组合物及方法。

[0092] 一方面,本发明提供多种可程序化的通用细胞受体(PUCR),其包含可经改造以靶

向任何所关注分子(例如,宿主癌症相关蛋白质或致病性生物体蛋白质)的催化性抗体或其催化性部分。一方面,本发明提供经改造以表现PUCR的细胞(例如,T细胞),其中该细胞可经定制化用于治疗用途(例如,细胞展现抗肿瘤性质)。在一些实施例中,细胞(例如,T细胞)经编码PUCR的核酸(例如mRNA、cDNA、DNA)转染。在一些实施例中,细胞经编码PUCR的核酸分子转变且PUCR是在细胞的细胞表面上表达。在一些实施例中,细胞(例如,T细胞)经编码PUCR的病毒载体转导。在一些实施例中,病毒载体是逆转录病毒载体。在一些实施例中,病毒载体是慢病毒载体。在一些实施例中,细胞稳定表达PUCR。在其他实施例中,细胞瞬时表达PUCR。在一些实施例中,细胞可诱导地表达PUCR。

[0093] 一方面,PUCR的催化性抗体区包含全长催化性抗体或该催化性抗体的催化性部分。一方面,催化性抗体或其催化性部分是非人类(例如,鼠类)抗体或其催化性部分。

[0094] 一方面,催化性抗体或其催化性部分是人源化催化性抗体或其催化性部分。非人类催化性抗体或其催化性部分的人源化在临床环境中可是合意的,其中非人类特异性残基可在接受包含施用PUCR的治疗的患者中诱导抗非人类抗体反应。

[0095] 一方面,PUCR的催化性抗体区包含催化性scFv抗体片段。一方面,PUCR的催化性抗体区包含催化性scFv抗体片段,其与产生其的scFv的鼠类序列相比经人源化。亲代鼠类scFv氨基酸序列是本文中以SEQ ID NO:3提供的鼠类38C2 scFv氨基酸序列。在一个实施例中,亲代鼠类scFv序列是由本文中以SEQ ID NO:13提供的核酸序列编码。在一个实施例中,PUCR的催化性抗体区包含本文中以SEQ ID NO:4提供的人源化38C2 scFv构筑体。在一个实施例中,PUCR的催化性抗体区是由本文中以SEQ ID NO:14提供的核酸序列编码。

[0096] 另一方面,PUCR的催化性抗体区包含催化性scFab。在一些实施例中,催化性scFab源自鼠类38C2催化性抗体。在一些实施例中,催化性scFab源自人源化38C2催化性抗体。在一些实施例中,催化性scFab包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性scFab包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性scFab包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性scFab包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性scFab包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施例中,催化性scFab包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。在一个实施例中,PUCR的催化性抗体区是由本文中以SEQ ID NO:47提供的核酸序列编码。

[0097] 表1. 示例性催化性抗体区序列

[0098]

scFv	序列
鼠类38C2 scFv氨基酸 序列 scFv呈VL-连接体-VH 构形。加下划线的序列 是多Gly4Ser连接体。	DVVMTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSL LHTYGS PYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYFCSQGTHLPYTFG GGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVKLVESGGG LVQPGGTMKLSCEISGLTFRNYWMSWVRQSPEK GLEWVAEIRLRSDNYATHYAESVKGKFTISRDDS KSRLYLQMNSLRTE DTGIYYCKTYFY SFSYWGQ GTLVTVSA (SEQ ID NO: 3)
鼠类38C2 scFv核酸序 列	GATGTAGTTATGACCCAGACGCCTCTTTCTCTC CCCGTCCGGCTCGGAGACCAAGCCTCCATCTCT TGCCGAAGTTCACAATCATTGTTGCACACGTAT GGATCCCCATATCTGAATTGGTATCTCCAAAAG CCTGGACAGTCCCCCAAGCTGTTGATCTATAAA GTAAGTAATAGATTTTCCGGCGTTCCTGACCGC TTCAGTGGCTCAGGAAGCGGTACGGATTTTACT CTTCGGATTTCCCGCGTCGAAGCTGAAGATCTT GGTGTCTATTTCTGTTCTCAGGGAACGCACCTG CCATACACATTCGGAGGGGGGCACTAAGCTCGA AATCAAGGGCGGGGGCGGGTCAGGTGGTGGGG GCAGCGGCGGGGGTGGCAGCGAGGTTAAGCTT GTGGAAAGTGGAGGCGGGCTTGTGCAGCCGGG CGGGACCATGAAACTGTCCTGCGAGATAAGTG GACTCACTTTTAGGAACTATTGGATGAGCTGGG TGCGACAGTCCCCGAGAAGGGCCTTGAATGG GTTGCCGAAATACGGCTTCGATCAGACA ACTAT GCGACGCACTACGCTGAAAGCGTCAAAGGAAA ATTC ACTATCAGCCGGGACGACAGCAAGAGTA GACTTTATTTGCAGATGAATAGTTTGAGGACGG

[0099]

	AAGATACGGAATATATTATTGCAAAACATAC TTCTATTCATTTTCATACTGGGGTCAGGGCACG TTGGTTACGGTTTCAGCC (SEQ ID NO: 13)
人源化38C2 scFv scFv呈VL-连接体-VH 构形。加下划线的序列 是多Gly4Ser连接体。	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLHTYGS PYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSG SGSGTDFLTISLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFG GGTKVEIK <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> SEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQSPEK GLEWVSEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTGIYYCKTYFYFSYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 4)
人源化38C2 scFv核酸 序列	GAGCTTCAGATGACCCAAAGTCCCAGCTCTCTC TCCGCCTCTGTCGGAGACAGGGTCACGATAAC CTGTCGAAGTAGCCAGAGTCTTCTCCATACTTA CGGAAGCCCATATCTTAACTGGTATCTTCAGAA ACCCGGTCAATCACCCAAGCTGCTGATATATAA AGTGTCTAACCGGTTTTCTGGTGTGCCGAGTCG ATTTTCAGGATCAGGGAGCGGCACGGATTTCA CTCTTACGATCTCTAGTTTGCAACCTGAGGATT TTGCTGTATACTTTTGCAGCCAAGGTACTCATC TTCCTTATACGTTTCGGAGGGGGTACCAAAGTAG AAATTAAAGGAGGAGGAGGGTCCGGAGGAGG GGGCAGCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTACAA CTCGTGGAATCTGGCGGGGGGCTGGTGCAACC TGGGGGTTCTCTCCGCCTGAGCTGTGCTGCATC CGGCTTCACCTTTTCTAATTATTGGATGAGCTG GGTACGGCAGTCACCGGAGAAAGGTCTGGAGT GGGTGTCTGAGATACGACTTAGATCAGACAAC TACGCGACGCATTACGCCGAGAGCGTGAAAGG AAGATTTACCATAAGCAGAGACAATTCAAAAA ACACCCTGTACCTCCAAATGAATAGCCTCAGG

[0100]

	GCGGAAGATACTGGGATATATTACTGTAAAC CTACTTTTACAGTTTTAGTTATTGGGGCCAGGG AACGCTTGTAAGTGTAGCTCT (SEQ ID NO: 14)
具有信号肽的全长人源 化38C2 scFab	MEWSWVFLFSLVTTGVHSELQMTQSPSSLSASV GDRVITICRSSQSLLHTYGPSYLNWYLQKPGQSP KLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYWMSWVRQSPKGLEWVSEIRLRSDNY ATHYAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TGIYYCKTYFYFSYWGQGT LTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 44)
无信号肽的全长人源化 38C2 scFab	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLLHTYGS PYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQSPKGL EWVSEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTGIYYCKTYFYFSYWGQGT

[0101]

	LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 104)
人源化38C2 scFab核酸 序列	AGCGAACTGCAGATGACCCAGTCCCCATCCAG TCTGAGCGCTAGCGTTGGTGACAGAGTTACTAT CACCTGCCGCTCTTCACAGAGCCTGTTGCACAC TTACGGCTCTCCTTACCTGAACTGGTATCTTCA GAAGCCTGGCCAAAGCCCTAAGCTGCTCATCT ACAAGGTGTCTAACAGGTTCTCCGGGGTTCCGT CCCGCTTTTCAGGGAGCGGGTCAGGAACAGAC TTCACCTTGACAATCTCAAGCCTCCAGCCCGAG GATTTTGCCGTCTATTTCTGCTCACAAGGCACA CATCTGCCGTATACCTTTGGGGGGCGGGACAAA AGTCGAGATCAAAAGGACCGTCGCTGCACCAT CCGTGTTTATCTTCCCACCAAGTGACGAACAGC TCAAGAGCGGTACTGCCTCCGTTGTTTGTCTGC TGAACAACCTTCTATCCAAGGGAAGCAAAGGTG CAATGGAAAGTAGACAACGCTCTGCAGTCAGG CAACTCCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGATA GCAAAGATTCAACATACAGCCTGAGCAGCACC CTCACCCTGAGTAAGGCCGATTACGAGAAGCA CAAGGTTTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTTTCATCCCCAGTCACCAAATCTTTTAACC GCGGCGAATGCGGGGGAGGCTCTGGTGGAGGC GGTTCTGGAGGGGGCTCAGGAGGAGGCGGTAG CGGCGGTGGTAGTGGGGGTGGCGGATCTGGCG GAGGTGGCTCAGGAGGAGGTAGCGGCGGCGGG GGCAGCGAGGTCCAGCTGGTAGAGTCAGGTGG AGGATTGGTGCAGCCCGGCGGCAGTCTTAGAC

[0102]

TCAGCTGTGCGGCCAGCGGATTTACTTTCTCAA
 ATTATTGGATGTCTTGGGTCAGGCAGAGCCCAG
 AGAAAGGCCTGGAATGGGTGTCAGAGATCCGA
 CTGAGAAGCGATAATTACGCGACTCATTATGC
 GGAAAGCGTTAAAGGTCGGTTCACTATTTACG
 AGATAATTCTAAGAATACCCTTTATCTGCAGAT
 GAACAGCTTGCGCGCCGAGGACACAGGCATCT
 ACTACTGTAAAACTTACTTCTATTCTTTTCTTA
 CTGGGGACAGGGGACTCTCGTTACAGTCAGTA
 GCGCCTCCACCAAGGGTCCTAGTGTCTTTCCCC
 TGGCCCCCTCATCCAAGTCCACGTCAGGAGGC
 ACCGCGGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAAGACTAC
 TTTCCTGAGCCAGTCACCGTGTCTGGAATTCC
 GGCGCGCTTACTTCTGGCGTGCACACTTTCCCC
 GCCGTCTCCAGAGCAGTGGGCTGTATTCCCTG
 TCTTCCGTAGTCACTGTGCCAAGCTCCAGTCTG
 GGAACCCAGACCTATATTTGTAATGTGAATCAT
 AAGCCGAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT
 GGAACCGAAGTCATGTGACAAAACCCACACT
 (SEQ ID NO: 47)

[0103] 在一个实施例中,这样的抗体片段的功能在于其保留催化生物化学反应的能力,例如其模拟天然醛缩酶,如同衍生出其的全长催化性抗体一般。在一个实施例中,这样的抗体片段的功能在于其提供可结合至所关注特异性剂的可程序化部分。在一个实施例中,这样的抗体片段的功能在于其提供可结合至所关注连接体的可程序化部分。

[0104] 一方面,本发明PUCR是由转基因编码,该转基因的序列已针对在哺乳动物细胞(例如,人类细胞)中的表达经密码子优化。在一些实施例中,本发明的整个PUCR构筑体是由转基因编码,该转基因的整个序列已针对在哺乳动物细胞(例如,人类细胞)中的表达经密码子优化。在其他实施例中,本发明PUCR构筑体的区域是由转基因编码,该转基因包含非密码子优化序列区域及密码子优化序列区域。密码子优化是指以下发现:同义密码子(即编码相同氨基酸的密码子)在编码DNA中的出现频率在不同生物体中有所不同。该密码子简并性容许不同核苷酸序列编码相同多肽。多种密码子优化方法为本领域已知(例如,参见美国专利第5,786,464号及第6,114,148号)。一方面,本发明PUCR包含细胞内域。在一些实施例中,细胞内域包含信号传导域。举例而言,在一些实施例中,信号传导域包含不限于以下的蛋白质的信号传导域或其片段:CD3- ζ 链、4-1BB及CD28信号传导模块及其任何组合。在一些实施例中,细胞内域包含共刺激信号传导域。举例而言,在一些实施例中,共刺激信号传导域包含

不限于以下的蛋白质的细胞内域或其片段：CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体及其任何组合。

[0105] 一方面，本发明PUCR包含跨膜域。在一些实施例中，跨膜域包含以下蛋白质的跨膜域或其片段：T细胞受体的 α 链、T细胞受体的 β 链、T细胞受体的 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD8 α 及其任何组合。

[0106] 根据本发明的一方面，PUCR包含铰链区。在一些实施例中，该铰链区是CD8铰链区。在一些实施例中，该铰链区是CD28铰链区。在一些实施例中，该铰链区是杂合CD8及CD28铰链区。

[0107] 根据本发明的一方面，PUCR偶联(即，结合)至特异性剂。在一些实施例中，特异性剂是以下中的一者或多者：结合蛋白(例如，抗原或其抗原结合片段)、肽、肽模拟物、小分子、治疗剂、靶向剂、蛋白质激动剂、蛋白质拮抗剂、代谢调节剂、激素、毒素或生长因子。

[0108] 此外，一方面，本发明提供PUCR组合物及其在尤其用于治疗癌症及由致病性生物体引起的疾病的药剂或方法中的用途。根据本发明的一方面，PUCR可用于抑制肿瘤生长。根据本发明的另一方面，PUCR可用于杀死传染原(例如，致病性生物体，例如细菌、原生动物、真菌或寄生虫)。

[0109] 一方面，本发明提供经改造以表达PUCR的细胞(例如，T细胞)，其中PUCR可经程序化以靶向任何所关注分子(例如，抗原)。在一些实施例中，所关注分子是癌症相关蛋白质。在一些实施例中，癌症相关蛋白质存于癌细胞的细胞膜上。在一些实施例中，所关注分子是来自致病性生物体的抗原。在一些实施例中，所关注分子是来自致病性生物体的抗原，其存于致病性生物体的细胞膜上。在一些实施例中，所关注分子是存于致病性生物体细胞的细胞膜上的抗原。在一些实施例中，所关注分子是来自致病性生物体的抗原，其存于经该致病性生物体感染的宿主细胞的细胞膜上。在一些实施例中，所关注分子是细胞外基质组分。在一些实施例中，所关注分子是复杂含碳水化合物分子(例如，糖蛋白)。在一些实施例中，所关注分子是病毒蛋白。在一些实施例中，所关注分子是蛋白质复合物。

[0110] 一方面，本发明提供制造定制化治疗性宿主细胞的方法，该定制化治疗性宿主细胞用于治疗疾病(例如，癌症或传染病)。另一方面，本发明提供在有需要的个体中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法。一方面，本发明进一步提供治疗由致病性生物体(例如，细菌、病毒、朊蛋白、真菌、寄生虫或原生动物)引起的医学病况的方法。

[0111] 一方面，本发明提供试剂盒，其包含表达本文所述PUCR的宿主细胞。

[0112] A. 可程序化的通用细胞受体(PUCR)

[0113] 本发明涵盖包含编码可程序化的通用细胞受体(PUCR)的序列的经分离核酸分子，其中PUCR包含催化性抗体或其催化性部分，其中催化性抗体或其部分的序列邻接编码跨膜域及细胞内域的核酸序列且与其在同一阅读框中。PUCR尤其有利，此乃因其可通过将一种或多种特异性剂附接至PUCR来程序化，此使得细胞能表达已经程序化的PUCR以靶向配体，特异性剂与该配体特异性结合。因此，PUCR可如期望经定制化以靶向任何所关注配体，使其尤其有利于免疫疗法。

[0114] 在本发明的一个实施例中，PUCR包含催化性抗体(例如，催化性38C2抗体)或其催

化性部分(例如,scFv或scFab);铰链区(例如,CD8铰链区或杂合CD8及CD28铰链区);跨膜域(例如,CD3 ζ 跨膜域或CD28跨膜域);细胞内域(例如,CD28细胞内域及/或CD3 ζ 细胞内域)。在一些实施例中,PUCR进一步包含信号肽。在一些实施例中,PUCR进一步包含可检测部分(例如,myc标签)。

[0115] 在本发明的一个实施例中,PUCR包含鼠类38C2 scFv或Fab片段或scFab、CD8铰链区;CD3 ζ 跨膜域;CD28细胞内域;及CD3 ζ 细胞内域。可选地,PUCR可包括N末端信号肽。可包括于PUCR中的替代性细胞内域包括(但不限于)4-1BB细胞内域、OX40细胞内域、CD30细胞内域、CD40细胞内域、ICOS细胞内域、LFA-1细胞内域、CD2细胞内域、CD7细胞内域、LIGHT细胞内域、LIGHT细胞内域、NKG2C细胞内域、CD83配体细胞内域。因此,在一些实施例中,PUCR包含鼠类38C2 scFv或Fab片段;CD8铰链区;CD3 ζ 跨膜域;及一个或多个选自以下的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体细胞内域。可包括于PUCR中的替代性跨膜域包括(但不限于)源自以下的跨膜域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS或FGFR2B。可包括于PUCR中的替代性铰链区包括(但不限于)以下的铰链区:抗体(例如,IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD)、(Gly4Ser)_n连接体或XTEN肽。

[0116] 在本发明的一个实施例中,PUCR包含人源化38C2 scFv、Fab片段或scFab;CD8铰链区;CD3 ζ 跨膜域;CD28细胞内域;及CD3 ζ 细胞内域。可选地,PUCR可包括N末端信号肽。可包括于PUCR中的替代性细胞内域包括(但不限于)4-1BB细胞内域、OX40细胞内域、CD30细胞内域、CD40细胞内域、ICOS细胞内域、LFA-1细胞内域、CD2细胞内域、CD7细胞内域、LIGHT细胞内域、LIGHT细胞内域、NKG2C细胞内域、CD83配体细胞内域。因此,在一些实施例中,PUCR包含人源化38C2 scFv或Fab片段、CD8铰链区;CD3 ζ 跨膜域;及一个或多个选自以下的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体细胞内域。可包括于PUCR中的替代性跨膜域包括(但不限于)源自以下的跨膜域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS或FGFR2B。可包括于PUCR中的替代性铰链区包括(但不限于)以下的铰链区:抗体(例如,IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD)、(Gly4Ser)_n连接体或XTEN肽。

[0117] 在本发明的一个实施例中,PUCR包含鼠类33F12 scFv或Fab片段或scFab、CD8铰链区;CD3 ζ 跨膜域;CD28细胞内域;及CD3 ζ 细胞内域。可选地,PUCR可包括N末端信号肽。可包括于PUCR中的替代性细胞内域包括(但不限于)4-1BB细胞内域、OX40细胞内域、CD30细胞内域、CD40细胞内域、ICOS细胞内域、LFA-1细胞内域、CD2细胞内域、CD7细胞内域、LIGHT细胞内域、LIGHT细胞内域、NKG2C细胞内域、CD83配体细胞内域。因此,在一些实施例中,PUCR包含鼠类33F12 scFv或Fab片段、CD8铰链区;CD3 ζ 跨膜域;及一个或多个选自以下的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、

LIGHT、NKG2C、CD83配体细胞内域。可包括于PUCR中的替代性跨膜域包括(但不限于)源自以下的跨膜域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS或FGFR2B。可包括于PUCR中的替代性铰链区包括(但不限于)以下的铰链区:抗体(例如,IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD)、(Gly4Ser)_n连接体或XTEN肽。

[0118] 在本发明的一个实施例中,PUCR包含人源化33F12 scFv或Fab片段或scFab、CD8铰链区;CD3 ζ 跨膜域;CD28细胞内域;及CD3 ζ 细胞内域。可选地,PUCR可包括N末端信号肽。可包括于PUCR中的替代性细胞内域包括(但不限于)4-1BB细胞内域、OX40细胞内域、CD30细胞内域、CD40细胞内域、ICOS细胞内域、LFA-1细胞内域、CD2细胞内域、CD7细胞内域、LIGHT细胞内域、LIGHT细胞内域、NKG2C细胞内域、CD83配体细胞内域。因此,在一些实施例中,PUCR包含人源化33F12 scFv或Fab片段、CD8铰链区;CD3 ζ 跨膜域;及一个或多个选自以下的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体细胞内域。可包括于PUCR中的替代性跨膜域包括(但不限于)源自以下的跨膜域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS或FGFR2B。可包括于PUCR中的替代性铰链区包括(但不限于)以下的铰链区:抗体(例如,IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD)、(Gly4Ser)_n连接体或XTEN肽。

[0119] 在本发明的一个实施例中,PUCR包含鼠类38C2 scFv或Fab片段或scFab;杂合CD8及CD28铰链区;CD28跨膜域;CD28细胞内域;及CD3 ζ 细胞内域。可选地,PUCR可包括N末端信号肽。可包括于PUCR中的替代性细胞内域包括(但不限于)4-1BB细胞内域、OX40细胞内域、CD30细胞内域、CD40细胞内域、ICOS细胞内域、LFA-1细胞内域、CD2细胞内域、CD7细胞内域、LIGHT细胞内域、LIGHT细胞内域、NKG2C细胞内域、CD83配体细胞内域。因此,在一些实施例中,PUCR包含鼠类38C2 scFv或Fab片段或scFab、杂合CD8及CD28铰链区;CD28跨膜域;及一个或多个选自以下的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体细胞内域。可包括于PUCR中的替代性跨膜域包括(但不限于)源自以下的跨膜域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS或FGFR2B。可包括于PUCR中的替代性铰链区包括(但不限于)以下的铰链区:抗体(例如,IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD)、(Gly4Ser)_n连接体或XTEN肽。

[0120] 在本发明的一个实施例中,PUCR包含人源化38C2 scFv或Fab片段或scFab;杂合CD8及CD28铰链区;CD28跨膜域;CD28细胞内域;及CD3 ζ 细胞内域。可选地,PUCR可包括N末端信号肽。可包括于PUCR中的替代性细胞内域包括(但不限于)4-1BB细胞内域、OX40细胞内域、CD30细胞内域、CD40细胞内域、ICOS细胞内域、LFA-1细胞内域、CD2细胞内域、CD7细胞内

域、LIGHT细胞内域、LIGHT细胞内域、NKG2C细胞内域、CD83配体细胞内域。因此,在一些实施例中,PUCR包含人源化38C2 scFv或Fab片段或scFab、杂合CD8及CD28铰链区;CD28跨膜域;及一个或多个选自以下的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体细胞内域。可包括于PUCR中的替代性跨膜域包括(但不限于)源自以下的跨膜域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1 T细胞辅助受体、CD2 T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS或FGFR2B。可包括于PUCR中的替代性铰链区包括(但不限于)以下的铰链区:抗体(例如,IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD)、(Gly4Ser)_n连接体或XTEN肽。

[0121] 在本发明的一个实施例中,PUCR包含鼠类33F12 scFv或Fab片段或scFab、杂合CD8及CD28铰链区;CD28跨膜域;CD28细胞内域;及CD3 ζ 细胞内域。可选地,PUCR可包括N末端信号肽。可包括于PUCR中的替代性细胞内域包括(但不限于)4-1BB细胞内域、OX40细胞内域、CD30细胞内域、CD40细胞内域、ICOS细胞内域、LFA-1细胞内域、CD2细胞内域、CD7细胞内域、LIGHT细胞内域、LIGHT细胞内域、NKG2C细胞内域、CD83配体细胞内域。因此,在一些实施例中,PUCR包含鼠类33F12 scFv或Fab片段或scFab、杂合CD8及CD28铰链区;CD28跨膜域;及一个或多个选自以下的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体细胞内域。可包括于PUCR中的替代性跨膜域包括(但不限于)源自以下的跨膜域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1 T细胞辅助受体、CD2 T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS或FGFR2B。可包括于PUCR中的替代性铰链区包括(但不限于)以下的铰链区:抗体(例如,IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD)、(Gly4Ser)_n连接体或XTEN肽。

[0122] 在本发明的一个实施例中,PUCR包含人源化33F12 scFv或Fab片段或scFab;杂合CD8及CD28铰链区;CD28跨膜域;CD28细胞内域;及CD3 ζ 细胞内域。可选地,PUCR可包括N末端信号肽。可包括于PUCR中的替代性细胞内域包括(但不限于)4-1BB细胞内域、OX40细胞内域、CD30细胞内域、CD40细胞内域、ICOS细胞内域、LFA-1细胞内域、CD2细胞内域、CD7细胞内域、LIGHT细胞内域、LIGHT细胞内域、NKG2C细胞内域、CD83配体细胞内域。因此,在一些实施例中,PUCR包含人源化33F12 scFv或Fab片段或scFab、杂合CD8及CD28铰链区;CD28跨膜域;及一个或多个选自以下的细胞内域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、CD83配体细胞内域。可包括于PUCR中的替代性跨膜域包括(但不限于)源自以下的跨膜域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1 T细胞辅助受体、CD2 T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS或FGFR2B。

[0123] 可包括于PUCR中的替代性铰链区包括(但不限于)以下的铰链区:抗体(例如,IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD)、(Gly4Ser)_n连接体或XTEN肽。

[0124] 1.催化性抗体

[0125] 在本发明的一方面中,PUCR包含催化性抗体或其催化性部分,在本文中称为“催化性抗体区”。催化性抗体是包含反应性氨基酸残基的免疫球蛋白,该反应性氨基酸残基使得其能在自组装过程中与多种分子实体反应且与分子实体相连接(例如,参见Guo等人(2006) *Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA* 103(29):11009-14;美国专利第5,733,757号)。多种催化性抗体及生成其的方法为本领域已知(例如,参见美国专利第6,210,938号、第6,368,839号、第6,326,176号、第6,589,766号及第5,985,626号、第5,733,757号、第5,500,358号、第5,126,258号、第5,030,717号及第4,659,567号;其全部内容是全文以引用方式并入本文中)。适用于本发明PUCR的催化性抗体可通过常规免疫、活体内反应性免疫或通过活体外反应性选择(例如使用噬菌体展示)来获得。

[0126] 在一些实施例中,催化性抗体是醛缩酶催化性抗体。醛缩酶催化性抗体包含具有 ϵ -氨基的反应性赖氨酸残基(例如,鼠类或人源化38C2的Lys93)。这些抗体经由反应性赖氨酸残基使用天然醛缩酶的烯胺机制催化醛醇及逆醛醇反应(Wagner等人(1995) *SCIENCE* 270,1797-1800;Barbas等人(1997) *SCIENCE* 278,2085-2092;Zhong等人(1999) *ANGEW.CHEM.INT.ED.* 38,3738-3741;Karlstrom等人(2000) *PROC.NAT'L.ACAD.SCI.USA*, 97:3878-3883)。因此,醛缩酶催化性抗体可共价连接至与所关注特异性剂结合的反应性部分,该反应性部分包含酮、二酮、 β 内酰胺、活性酯卤代酮、内酯、酸酐、马来酰亚胺、环氧化物、醛肟、胍、亚胺、烯胺、磷酸酯、膦酸酯、环氧化物、氮丙啶、硫代环氧化物、经遮蔽或经保护二酮(例如缩酮)、内酰胺、卤代酮、醛及诸如此类。在一些实施例中,催化性抗体是鼠类抗体38C2或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是鼠类抗体33F12或该抗体的嵌合或人源化形式(例如,参见Goswami等人(2009) *BIOORG.MED.CHEM.LETT.* 19(14):3821-4)。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤40F12产生的抗体(Zhu等人,(2004) *J.MOL.BIOL.* 343:1269-80;Rader等人,(1998))或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤42F1产生的抗体(Zhu等人,(2004);Rader等人,(1998))或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤85A2(ATCC登录号PTA-1015)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤85C7(ATCC登录号PTA-1014)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤92F9(ATCC登录号PTA-1017)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤93F3(ATCC登录号PTA-823)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤84G3(ATCC登录号PTA-824)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤84G11(ATCC登录号PTA-1018)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤84H9(ATCC登录号PTA-1019)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在一些实施例中,催化性抗体是杂交瘤85H6(ATCC登录号PTA-825)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。在其他实施例中,催化性抗体是杂交瘤90G8(ATCC登录号PTA-1016)产生的抗体或该抗体的嵌合或人源化形式。其他醛缩酶催化性抗体为本领域已知(例如,参见Kumar等人(2009) *BIOORG.MED.CHEM.LETT.* 19(14):3821-4)。

[0127] 其他催化性抗体也可用于本发明PUCR中。举例而言,在一些实施例中,催化性抗体是 β 内酰胺酶催化性抗体。在其他实施例中,催化性抗体是酯酶催化性抗体(例如,参见Wirsching等人(1995) *SCIENCE* 270:1775-82)。在一些实施例中,催化性抗体是酰胺酶催化

性抗体。在其他实施例中,催化性抗体是硫酯酶催化性抗体(例如,参见Janda等人(1994) PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA 91:2532-2536)。

[0128] 在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分包含选自以下的反应性氨基酸残基:反应性半胱氨酸残基、反应性酪氨酸残基、反应性赖氨酸残基及反应性丝氨酸残基。举例而言,硫酯酶催化性抗体含有反应性半胱氨酸残基。硫酯酶催化性抗体可与含马来酰亚胺部分或其他硫醇反应性基团(例如碘乙酰胺、芳基卤化物、二硫氢基及诸如此类)共价连接。

[0129] 在一些实施例中,用于本发明PUCR中的催化性抗体或其催化性部分是形成可逆共价键联的催化性抗体。在其他实施例中,用于本发明PUCR中的催化性抗体或其催化性部分是形成不可逆共价键联的催化性抗体。举例而言,源自1,3-二酮的反应性免疫的催化性抗体形成可逆共价键联。由于此可逆性,结合至醛缩酶抗体(例如,38C2)的包含二酮衍生物化合物的反应性部分可经由与共价结合的半抗原JW(Wagner等人(1995) SCIENCE 270,1797-800)或相关化合物竞争自抗体释放。这允许根据需要立即中和特异性剂与PUCR的偶联。或者,催化性抗体形成不可逆共价键联。在PUCR经包含二酮反应性部分的特异性剂程序化时,使用形成不可逆共价键联的催化性抗体可尤其有利。不希望受限于任何具体理论,人们认为不管周围环境的pH如何(例如,pH 3.0至pH 11.0),这样的不可逆共价键联是稳定的。在靶向肿瘤时此稳定性尤其有利,这是因为一些肿瘤环境展现与正常组织环境相比降低的pH。这样的稳定性也有利于调配、递送及储存本发明PUCR。

[0130] 在一些实施例中,用于本发明PUCRs中的催化性抗体的催化性部分是scFv。在一些实施例中,scFv是源自鼠类醛缩酶催化性抗体38C2的scFv。在其他实施例中,scFv是源自人源化醛缩酶催化性抗体38C2的scFv。在一些实施例中,scFv是源自鼠类醛缩酶催化性抗体33F12的scFv。在其他实施例中,scFv是源自人源化醛缩酶催化性抗体33F12的scFv。

[0131] ScFvs可根据本领域已知的方法制备(参见例如Bird等人(1988) SCIENCE 242:423-426;及Huston等人(1988) PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA 85:5879-5883)。ScFv分子可通过使用柔性多肽连接体将VH及VL区连接在一起产生。在一些实施例中,用于本发明中的scFvs包含具有最佳长度及/或氨基酸组成的连接体(例如Ser-Gly连接体)。连接体长度可显著影响scFv的可变区折叠及相互作用的方式。关于连接体取向及大小的实例参见例如Hollinger等人(1993) PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA 90:6444-6448;美国专利申请公开案第2005/0100543号、第2005/0175606号、第2007/0014794号,及PCT公开案第W0 2006/020258号及第W0 2007/024715号,其内容是以引用方式并入本文中,且特别是关于连接体的揭示内容)。

[0132] 在一些实施例中,用于本发明PUCRs中的scFv在其VL区与VH区之间包含具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸残基的连接体。连接体序列可包含任何天然氨基酸。在一些实施例中,连接体序列包含氨基酸甘氨酸及丝氨酸。在其他实施例中,连接体序列包含甘氨酸及丝氨酸重复序列,例如(Gly₄Ser)_n,其中n是等于或大于1的正整数(SEQ ID NO:21)。在其他实施例中,连接体是(Gly₄Ser)₄(SEQ ID NO:22)或(Gly₄Ser)₃(SEQ ID NO:23)。连接体长度的变化可保留或增强活性,在活性研究中产生优异效能。

[0133] 在一些实施例中,用于本发明PUCRs中的催化性抗体的催化性部分是scFab。在一

些实施例中,scFab是源自鼠类醛缩酶催化性抗体38C2的scFab。在其他实施例中,scFab是源自人源化醛缩酶催化性抗体38C2的scFab。在一些实施例中,scFab是源自鼠类醛缩酶催化性抗体33F12的scFab。在其他实施例中,scFab是源自人源化醛缩酶催化性抗体33F12的scFab。

[0134] scFabs可根据本领域已知的方法来制备(例如,参见Hust等人(2007) BMC BIOTECHNOL.7:14;及Koerber等人(2015) J.MOL.BIOL.427 (2):576-86)。在一些实施例中,scFab包含具有至少30个氨基酸、优选介于32个与50个氨基酸之间的多肽连接体。在一些实施例中,多肽连接体是多GlySer连接体(例如,SEQ ID NO:54的连接体)。本领域技术人员将理解,用于本发明PUCR中的催化性抗体或其催化性部分可经修饰以改变其氨基酸序列(与野生型催化性抗体或其催化性部分相比),以增强或降低其催化活性,但不消除其催化活性。在一些实施例中,催化性抗体或其催化性部分(例如,scFv)与本文所揭示的催化性抗体或其催化性部分实质上相同。

[0135] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下,一致性百分比是指两个或更多个相同序列。在经比较及比对用于对比窗或指定区域中的最大对应性时,如使用以下序列对比算法中的一者或通过人工比对及目视检查所测量,若两个序列有指定百分比的氨基酸残基或核苷酸相同(例如,在指定区域中或未指定时在整个序列中,60%一致性,可选地70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致性),则两个序列“实质上一致”。在一些实施例中,在长度为至少约30个核苷酸(或10个氨基酸)的区域中,或更优选地在长度为60至150或600或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)的区域中存在一致性。

[0136] 对于序列对比,通常一个序列用作参照序列与测试序列进行比较。在使用序列对比算法时,将测试序列及参照序列输入计算机中,若需要指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数,或可指定替代参数。然后,序列对比算法基于程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列一致性百分比。用于对比的序列比对方法为本领域所熟知。用于对比的最佳序列比对可通过例如Smith及Waterman(1970) ADV. APPL. MATH. 2:482c的局部同源性算法、通过Needleman及Wunsch(1970) J.MOL.BIOL.48:443-53的同源性比对算法、通过Pearson及Lipman(1988) PROC. NAT'L. ACAD. SCI. USA 85:2444的搜索相似性方法、通过这些算法的计算机化执行(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA)或通过人工比对及目视检查来实施。适于测定序列一致性及序列相似性百分比的算法的两个实例是BLAST及BLAST 2.0算法,其分别阐述于Altschul等人,(1977) NUC. ACIDS RES. 25:3389-3402;及Altschul等人(1990) J.MOL.BIOL.215:403-410中。用于执行BLAST分析的软件可借助国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。两个氨基酸序列之间的一致性百分比也可使用已并入ALIGN程序(2.0版)中的E.Meyers及W.Miller(1988) COMPUT. APPL. BIOSCI. 4:11-17的算法、使用PAM 120权重残基表、12的空位长度罚分及4的空位罚分来测定。另外,两个氨基酸序列之间的一致性百分比可使用已纳入GCG软件包(可在www.gcg.com获得)的GAP程序中的Needleman及Wunsch(1970) J.MOL.BIOL.48:444-453所揭示的算法、使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵及16、14、12、10、8、6或4的空位权重以及1、2、3、4、5或6的长度权重来测定。

[0137] 2. 跨膜域

[0138] 本发明PUCRs的跨膜域可呈本领域已知的任何形式。如本文所用术语“跨膜域”是指在细胞膜、优选真核细胞膜(例如,哺乳动物细胞膜)中热力学稳定的任何多肽结构。相容用于本文所揭示的PUCRs中的跨膜域可从任何天然跨膜蛋白质或其片段获得。或者,跨膜域可为在细胞膜(例如,哺乳动物细胞膜)中热力学稳定的合成非天然跨膜蛋白质或其片段,例如疏水蛋白质区段。典型跨膜域包含约15至约35个疏水氨基酸残基,其形成跨越约30埃细胞膜双层的螺旋。

[0139] 在一些实施例中,跨膜域源自I型膜蛋白,即具有单一跨膜区域的膜蛋白,其经取向使得蛋白质的N末端存于细胞的脂质双层的细胞外侧上且蛋白质的C末端存于细胞质侧上。在一些实施例中,跨膜蛋白质可源自II型膜蛋白,即具有单一跨膜区域的膜蛋白,其经取向使得蛋白质的C末端存于细胞的脂质双层的细胞外侧上且蛋白质的N末端存于细胞质侧上。在其他实施例中,跨膜域源自III型膜蛋白,即具有多个跨膜区段的膜蛋白。

[0140] 在一些实施例中,本发明PUCRs的跨膜域源自I型单次穿膜蛋白。单次穿膜蛋白包括(但不限于)CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS及FGFR2B。在一些实施例中,跨膜域源自选自以下的膜蛋白:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1T细胞辅助受体、CD2T细胞辅助受体/黏着分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS及FGFR2B。在一些实施例中,跨膜域源自CD8 α 。在一些实施例中,跨膜域源自4-1BB/CD137。在其他实施例中,跨膜域源自CD28或CD34。在一些实施例中,跨膜域是合成域。在一些实施例中,合成跨膜域主要包含疏水残基,例如亮氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,将在合成跨膜域的每一端发现苯丙氨酸、色氨酸及缬氨酸的三联体。可选地,例如长度介于2个与10个氨基酸之间的多肽连接体可在PUCR的跨膜域与细胞内域之间形成键联。在一些实施例中,多肽连接体是甘氨酸-丝氨酸二联体。

[0141] 用于本文所述PUCRs中的跨膜域也可包含合成非天然蛋白质区段的至少一部分。在一些实施例中,跨膜域是合成非天然 α 螺旋或 β 褶皱。在一些实施例中,蛋白质区段的长度为至少约20个氨基酸,例如至少18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个氨基酸。合成跨膜域的实例为本领域已知,例如的美国专利第7,052,906 B1号及PCT公开案第W0 2000/032776 A2号中,其内容是以引用方式并入本文中,且具体而言,揭示内容是关于合成跨膜域)。

[0142] 在一些实施例中,跨膜域的氨基酸序列不包含半胱氨酸残基。在一些实施例中,跨膜域的氨基酸序列包含1个半胱氨酸残基。在一些实施例中,跨膜域的氨基酸序列包含2个半胱氨酸残基。在一些实施例中,跨膜域的氨基酸序列包含2个以上半胱氨酸残基(例如,3、4、5或更多个)。

[0143] 在一些实施例中,PUCR的跨膜域包含CD3 ζ 的跨膜域或其功能部分,例如包含氨基酸序列LDPKLCYLLDGILFIYGVILT ALFLRVK(SEQ ID NO:6)或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或更高序列一致性的氨基酸序列的跨膜域。在一些实施例中,PUCR的跨膜域包含由SEQ ID NO:16的核酸序列或与SEQ ID NO:16的核酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的核酸序列编码的CD3 ζ 的跨膜域。氨基酸序列LCYLLDGILFIYGVILTALFL (SEQ ID NO:38) 是CD3 ζ 跨膜域序列的经定义疏水延伸段。

[0144] 在一些实施例中,PUCR的跨膜域包含人类CD28 (例如,登录号P01747.1) 或其功能部分的跨膜域,例如包含氨基酸序列FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:24) 或与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列的跨膜域。在一些实施例中,CD28的跨膜域包含氨基酸序列IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:25) 或与SEQ ID NO:25的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,PUCR的跨膜域包含由SEQ ID NO:61的核酸序列或与SEQ ID NO:61的核酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的核酸序列编码的CD28的跨膜域。

[0145] 3. 细胞内域

[0146] 本文所揭示的PUCRs包含细胞内域或区域。在一些实施例中,PUCRs的细胞内域包含信号传导域。信号传导域通常负责活化表达PUCR的细胞 (例如免疫细胞 (例如T细胞)) 的至少一种正常效应功能。术语“效应功能”是指细胞的特有功能。例如,T细胞的效应功能可包括细胞溶解活性或辅助活性,包括例如分泌细胞因子。因此,术语“信号传导域”是指转导效应功能信号且引导细胞实施特有功能的蛋白质部分。尽管通常可采用整个细胞内信号传导域,但在许多情形中无需使用整个链或域。因此,就使用细胞内信号传导域的截短部分而言,可使用该截短部分来代替完整域,只要其转导效应功能信号即可。因此,术语“信号传导域”也包括信号传导域的足以转导效应功能信号的任何截短部分。然而,在一些实施例中,PUCR包含在表达PUCR的细胞中不转导效应功能信号的信号传导域。适用于本文所揭示PUCRs中的细胞内信号传导域的实例包括T细胞受体 (TCR) 及在抗原受体衔接后协同作用于起始信号转导的辅助受体的细胞质序列,以及这些序列的任何衍生物或变体及具有相同功能能力的任何重组序列。

[0147] 初级信号传导域以刺激方式或以抑制方式调控TCR复合物的初级活化。以刺激方式起作用的初级信号传导域可含有信号传导基序,称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。用于本发明PUCRs中的含有ITAMs的初级信号传导域包括 (但不限于) 以下的信号传导域:TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d。在一些实施例中,本发明PUCR包含CD3 ζ 的信号传导域。在其他实施例中,本发明PUCR包含CD28的信号传导域。在本发明的一些实施例中,PUCR包含4-1BB (也称为CD137) 的信号传导域。在本发明的一些实施例中,PUCR包含本文所述的两个或更多个信号传导域的组合。在本发明的一些实施例中,PUCR包含CD28的信号传导域及CD3 ζ 的信号传导域二者。在本发明的一些实施例中,PUCR包含CD28的信号传导域及4-1BB的信号传导域二者。在本发明的一些实施例中,PUCR包含4-1BB的信号传导域及CD3 ζ 的信号传导域二者。

[0148] 在本发明的一些实施例中,PUCR包含CD28的细胞内域。在一些实施例中,CD28细胞内域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,CD28细胞内域是由SEQ ID NO:17的核酸序列或与SEQ ID NO:17的核酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的核酸序列编码。

[0149] 在本发明的一些实施例中,PUCR包含CD3 ζ 的细胞内域。在一些实施例中,CD3 ζ 的细胞内域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3 ζ 细胞内域是由SEQ ID NO:18的核酸序列或与SEQ ID NO:18的核酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的核酸序列编码。

[0150] 在本发明的一些实施例中,PUCR包含CD3 ζ 的细胞内域。在一些实施例中,CD3 ζ 的细胞内域包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列或其功能部分或与SEQ ID NO:59的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,CD3 ζ 细胞内域是由SEQ ID NO:62的核酸序列或与SEQ ID NO:62的核酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的核酸序列编码。

[0151] 在本发明的一些实施例中,PUCR包含4-1BB的细胞内域。4-1BB是在CD28活化后表达的肿瘤坏死因子受体家族成员。在一些实施例中,4-1BB细胞内域包含氨基酸序列KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:26)、其功能部分或与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,4-1BB细胞内域是由SEQ ID NO:27的核酸序列或与SEQ ID NO:27的核酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的核酸序列编码。

[0152] 表2. 示例性细胞内域序列

[0153]

CD28细胞内域氨基酸序列	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRS (SEQ ID NO: 7)
---------------	---

[0154]

CD28细胞内域核酸序列	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCG GGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGC CCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO: 17)
CD3 ζ 细胞内域氨基酸序列	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 8)
CD3 ζ 细胞内域核酸序列	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCT ATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG GGACCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAGAAG GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGA ACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG GAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCA GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTC GCTAA (SEQ ID NO: 18)
CD3 ζ 细胞内域氨基酸序列	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 59)

[0155]

CD3 ζ 细胞内域核酸序列	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCT ATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG AGTACGATGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG GGACCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAGAAG GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGA ACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG GAGGGGCAAGGGGGCACGATGGCCTTTACCA GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTC GCTAA (SEQ ID NO: 62)
4-1BB细胞内域氨基酸序列	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 26)
4-1BB细胞内域核酸序列	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAT TCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAAC TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGA TTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA CTG (SEQ ID NO: 27)

[0156] 在一些实施例中,用于本发明PUCR中的信号传导域包含与天然ITAM相比已经改变(例如,经突变或经截短)的经修饰ITAM。在一些实施例中,该经修饰ITAM具有与天然ITAM相比增加的活性。在一些实施例中,该经修饰ITAM具有与天然ITAM相比降低的活性。在一些实施例中,信号传导域包含1个ITAM。在一些实施例中,信号传导域包含多个(例如,1、2、3、4或更多个)ITAM。

[0157] 在一些实施例中,本发明PUCR的细胞内域包含共刺激信号传导域。在一些实施例中,本发明PUCR的细胞内域包含信号传导域及共刺激域。如本文所用术语“共刺激信号传导域”是指蛋白质中介导细胞内的信号转导以诱导反应、例如效应功能的部分。本发明PUCR的共刺激信号传导域可为来自共刺激蛋白质的细胞质信号传导域,其转导信号并调节由免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)介导的反应。

[0158] 用于嵌合受体中的共刺激信号传导域的实例可为共刺激蛋白质的细胞质信号传导域,包括但不限于B7/CD28家族的成员(例如,B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/

CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC及PDCD6) ; TNF超家族的成员(例如, 4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFSF13C、CD27/TNFSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFSF25、GITR/TNFSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素- α /TNF- β 、OX40/TNFSF4、OX40配体/TNFSF4、REL T/TNFSF19L、TACI/TNFSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- α 及TNF RII/TNFSF1B) ; 白细胞介素-1受体/类铎受体(TLR)超家族的成员(例如, TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9及TLR10) ; SLAM家族的成员(例如, 2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6及SLAM/CD150) ; 及任何其他共刺激分子, 例如CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、I类HLA、HLA-DR、ikaros、整联蛋白 α 4/CD49d、整联蛋白 α 4 β 1、整联蛋白 α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP10、DAP12、MYD88、TRIF、TIRAP、TRAF、Dectin-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)及NKG2C。在一些实施例中, 共刺激域包含选自以下的活化受体蛋白质的细胞内域: α 4 β 1整联蛋白、 β 2整联蛋白(CD11a-CD18、CD11b-CD18、CD11b-CD18)、CD226、CRTAM、CD27、NKp46、CD16、NKp30、NKp44、NKp80、NKG2D、KIR-S、CD100、CD94/NKG2C、CD94/NKG2E、NKG2D、PEN5、CEACAM1、BY55、CRACC、Ly9、CD84、NTBA、2B4、SAP、DAP10、DAP12、EAT2、FcR γ 、CD3 ζ 及ERT。在一些实施例中, 共刺激域包含选自以下的抑制性受体蛋白质的细胞内域: KIR-L、LILRB1、CD94/NKG2A、KLRG-1、NKR-P1A、TIGIT、CEACAM、SIGLEC 3、SIGLEC7、SIGLEC9及LAIR-1。在一些实施例中, 共刺激域包含选自以下的蛋白质的细胞内域: CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及特异性结合CD83的配体及诸如此类。

[0159] 在一些实施例中, 用于本发明PUCR中的共刺激信号传导域包含与天然共刺激信号传导域相比已经改变(例如, 经突变或经截短)的经修饰共刺激信号传导域。在一些实施例中, 共刺激信号传导域与野生型共刺激信号传导域相比包含至多10个(例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)氨基酸残基变异。包含一个或多个氨基酸变异的共刺激信号传导域可称为变体共刺激信号传导域。共刺激信号传导域中一个或多个氨基酸残基的突变可导致相对于不包含突变的共刺激信号传导域, 信号传导转导增加及细胞反应刺激增强。或者, 共刺激信号传导域中一个或多个氨基酸残基的突变可导致相对于不包含突变的共刺激信号传导域, 信号传导转导降低及细胞反应刺激减小。举例而言, 天然CD28氨基酸序列中残基186及187的突变可导致共刺激活性增加及通过PUCR的共刺激信号传导域诱导免疫反应。在一些实施例中, 突变是在CD28共刺激信号传导域中在位置186及187中的每一者用甘氨酸残基取代赖氨酸, 称为CD28_{LL-GG}变体。可在共刺激信号传导域中进行的可增强或降低域的共刺激活性的其他突变将为本领域技术人员显而易见。

[0160] 在一些实施例中, 本发明PUCR可包含大于一个的共刺激信号传导域(例如, 2、3、4、5、6、7、8或更多个共刺激信号传导域)。在一些实施例中, PUCR包含两个或更多个来自不同共刺激蛋白质、例如本文所述的任两个或更多个共刺激蛋白质的共刺激信号传导域。在一些实施例中, PUCR包含两个或更多个来自相同共刺激蛋白质的共刺激信号传导域(即, 重复序列)。

[0161] 共刺激信号传导域的类型选择可基于多种因素,例如将表达PUCR的宿主细胞的类型(例如,T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性球或嗜酸性粒细胞)及期望的细胞效应功能(例如,免疫效应功能)。

[0162] 细胞内域中的信号传导序列(即,信号传导域及/或共刺激信号传导域)可以随机或指定顺序连接至彼此。PUCR的细胞内域可包含一个或多个安置于信号传导序列之间的连接体。在一些实施例中,连接体可为短寡肽或多肽连接体,例如长度介于2个与10个氨基酸之间(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)。在一些实施例中,连接体的长度可多于10个氨基酸。在本发明PUCR的细胞内域中可使用本文所揭示或本领域技术人员显而易见的任何连接体。

[0163] 4. 铰链区

[0164] 在一些实施例中,PUCR进一步包含铰链区。在一些实施例中,铰链区位于催化性抗体区与跨膜域之间。铰链区是通常发现于蛋白质的两个域之间且可容许PUCR的柔性及一个或两个域相对于彼此的运动的氨基酸区段。可使用提供该柔性及催化性抗体区相对于PUCR的跨膜域的运动任何氨基酸序列。

[0165] 在一些实施例中,铰链区包含约10至约100个氨基酸,例如约15至约75个氨基酸、约20至约50个氨基酸或约30至约60个氨基酸。在一些实施例中,铰链区的长度为10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸。在一些实施例中,铰链区的长度为大于100个氨基酸。

[0166] 在一些实施例中,铰链区是天然蛋白质的铰链区。本领域已知包含铰链区的任何蛋白质的铰链区可用于本文所述的PUCRs中。在一些实施例中,铰链区是天然蛋白质的铰链区的至少一部分且将柔性赋予PUCR的细胞外区域。

[0167] 在一些实施例中,铰链区是CD8铰链区。在一些实施例中,铰链区是CD8 α 铰链区。在一些实施例中,铰链区是CD8铰链区的一部分,例如CD8铰链区的含有至少15个(例如,20、25、30、35或40个)邻接氨基酸的片段。在一些实施例中,铰链区是CD8 α 铰链区的一部分,例如CD8 α 铰链区的含有至少15个(例如,20、25、30、35或40个)邻接氨基酸的片段。CD8铰链区可包含SEQ ID NO:5或其功能部分的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。或者,CD8铰链区可包含SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29或其功能部分的氨基酸序列或与SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,CD8铰链区是由SEQ ID NO:30的核酸序列或与SEQ ID NO:30的核酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的核酸序列编码。

[0168] 在一些实施例中,铰链区是杂合CD8及CD28铰链区。在一些实施例中,杂合CD8及CD28铰链区可包含SEQ ID NO:55或其功能部分的氨基酸序列或与SEQ ID NO:55的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,杂合CD8及CD28铰链区可包含SEQ ID NO:56或其功能部分的氨基酸序列或与SEQ ID NO:56的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或

更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,杂合CD8及CD28铰链区可包含SEQ ID NO: 58或其功能部分的氨基酸序列或与SEQ ID NO:58的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的氨基酸序列。在一些实施例中,杂合CD8及CD28铰链区可包含连接体序列(例如,SEQ ID NO: 57的连接体序列)。在一些实施例中,CD8及CD28铰链区是由SEQ ID NO:60的核酸序列或与SEQ ID NO:60的核酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性的核酸序列编码。

[0169] 表3. 示例性铰链区序列

[0170]

CD8铰链氨基酸序列	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA (SEQ ID NO: 5)
CD8铰链核酸序列	GCTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACCAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCC (SEQ ID NO: 15)
CD8铰链氨基酸序列	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAXRPAAGGAVHTRGLDFA, 其中X是除半胱氨酸以外的任何氨基酸(SEQ ID NO: 28)
CD8铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 29)
CD8铰链核酸序列	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 30)
杂合CD8及CD28铰链氨基酸序列	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (SEQ ID NO: 55)

[0171]

杂合CD8及CD28铰链氨基酸序列的CD8部分	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA (SEQ ID NO: 56)
铰链连接体氨基酸序列	PR (SEQ ID NO: 57)
杂合CD8及CD28铰链氨基酸序列的CD28部分	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP (SEQ ID NO: 58)
杂合CD8及CD28铰链核酸序列	GCTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCTAGGAAAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCC C (SEQ ID NO: 60)

[0172] 在一些实施例中,铰链区是抗体(例如,IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体)的铰链区。在一些实施例中,铰链区是接合抗体的恒定域CH1及CH2的铰链区。在一些实施例中,铰链区是抗体铰链区且包含抗体的铰链区及抗体的一个或多个恒定区。在一些实施例中,铰链区包含抗体的铰链区及抗体的CH3恒定区。在一些实施例中,铰链区包含抗体的铰链区及抗体的CH2及CH3恒定区。

[0173] 在一些实施例中,铰链区是非天然肽。在一些实施例中,铰链区安置于催化性域的C末端与PUCR的跨膜域的N末端之间。在一些实施例中,铰链区是 $(\text{Gly}_x\text{Ser})_n$ 连接体,其中x及n可独立地为介于3与12之间的整数,包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更大。在一些实施例中,铰链区是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中n可为介于3与60之间或更大的整数,包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60。在一些实施例中,铰链区是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (SEQ ID NO:23)。在一些实施例中,铰链区是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_6$ (SEQ ID NO:31)。在一些实施例中,铰链区是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_9$ (SEQ ID NO:32)。在一些实施例中,铰链区是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{12}$ (SEQ ID NO:33)。在一些实施例中,铰链区是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{15}$ (SEQ ID NO:34)。在一些实施例中,铰链区是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{30}$ (SEQ ID NO:35)。在一些实施例

中,铰链区是(Gly₄Ser)₄₅(SEQ ID NO:36)。在一些实施例中,铰链区是(Gly₄Ser)₆₀(SEQ ID NO:37)。在一些实施例中,铰链区是多GlySer连接体(SEQ ID NO:54)。

[0174] 在一些实施例中,铰链区是延长重组体多肽(XTEN),其是由不同长度(例如,10-80个氨基酸残基)的亲水残基组成的未结构化多肽。XTEN肽的氨基酸序列为本领域已知(例如,参见美国专利第8,673,860号,其内容是以引用方式并入本文中)。在一些实施例中,铰链区是XTEN肽且包含60个氨基酸。在一些实施例中,铰链区是XTEN肽且包含30个氨基酸。在一些实施例中,铰链区是XTEN肽且包含45个氨基酸。在一些实施例中,铰链区是XTEN肽且包含15个氨基酸。

[0175] 5. 信号肽

[0176] 在一些实施例中,本文所揭示的PUCRs进一步包含多肽N末端的信号肽(也称为信号序列)。一般而言,信号序列是将多肽靶向细胞中的期望位点的肽序列。在一些实施例中,信号序列将PUCR靶向细胞的分泌路径且将允许PUCR整合并锚定至细胞膜的脂质双层中。可兼容的用于本文所述PUCRs中的信号序列(包括天然蛋白质的信号序列或合成非天然信号序列)将为本领域技术人员显而易见。在一些实施例中,用于本发明PUCRs中的信号序列是CD8 α 的信号序列。在其他实施例中,信号序列是CD28的信号序列。在一些实施例中,信号序列是鼠类 κ 链的信号序列。在其他实施例中,信号序列是CD16的信号序列。在一些实施例中,信号序列是鼠类免疫球蛋白重链的信号序列。在一些实施例中,信号肽包含氨基酸序列MEWSWVFLFFLSVTTGVHS(SEQ ID NO:1)。在一些实施例中,信号肽是由SEQ ID NO:11的核酸序列编码。在一些实施例中,信号肽是由SEQ ID NO:46的核酸序列编码。

[0177] B. 特异性剂

[0178] 本文所述PUCRs的一个优点在于,其可经程序化以赋予PUCR对任何靶分子(例如,抗原)的特异性。因此,特异性剂可偶联及/或附接至PUCR并将PUCR程序化以靶向任何所关注分子(例如,抗原)。在一些实施例中,特异性剂包含结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)。因此,在本发明的一些实施例中,PUCR可偶联至包含抗体或其抗原结合部分的特异性剂,以产生具有对所关注抗原的特异性的经程序化的PUCR。在一些实施例中,该结合蛋白是抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,该结合蛋白是配体。在一些实施例中,该结合蛋白是细胞因子。在一些实施例中,该结合蛋白是受体。

[0179] 在一些实施例中,特异性剂包含肽(例如,包含一个或多个Arg-Gly-Asp(RGD)基序的肽)。在一些实施例中,特异性剂包含肽模拟物(例如,RGD肽模拟物)。在其他实施例中,特异性剂包含小分子(例如,叶酸或2-[3-(1,3-二羧基丙基)-脲基]戊二酸(DUPA))。在一些实施例中,特异性剂包含治疗剂。在其他实施例中,特异性剂包含靶向剂。在一些实施例中,特异性剂包含蛋白质激动剂。在其他实施例中,特异性剂包含代谢调节剂。在一些实施例中,特异性剂包含激素。在其他实施例中,特异性剂包含毒素。在一些实施例中,特异性剂包含生长因子。在一些实施例中,特异性剂包含可检测部分,例如但不限于生物素。在其他实施例中,特异性剂包含配体。在一些实施例中,特异性剂包含蛋白质。在其他实施例中,特异性剂包含类肽。在一些实施例中,特异性剂包含DNA适配体。在其他实施例中,特异性剂包含肽核酸。在一些实施例中,特异性剂包含维生素。在其他实施例中,特异性剂包含基质或基质类似物。在一些实施例中,特异性剂包含环状精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽(cRGD)。

[0180] 在一些实施例中,特异性剂结合至癌症相关蛋白质。在一些实施例中,特异性剂包

含特异性结合癌症相关蛋白质的抗体或其抗原结合片段。抗原结合片段的实例包括(但不限于)Fab片段或scFv。

[0181] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是在癌细胞(例如,肿瘤细胞)中大量表达的蛋白质。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是在癌细胞(例如,肿瘤细胞)表面上大量表达的蛋白质。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是癌症生物标记。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是选自以下的蛋白质:CD19、VEGFR2、PSMA、CEA、GM2、GD2、GD3、EGFR、EGFRvIII、HER2、IL13R、叶酸受体及MUC-1。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是整联蛋白(例如, $\alpha_v\beta_3$)。在一些实施例中,癌症相关蛋白质选自:胆囊收缩素B受体、促性腺激素释放激素受体、生长抑素受体2、胃泌素释放肽受体、神经激肽1受体、黑皮质素1受体、神经调压素受体、神经肽Y受体及C-型凝集素样分子1。在一些实施例中,特异性剂包含表4中列示的靶向分子。在一些实施例中,特异性剂结合至与癌症相关的碳水化合物抗原。在一些实施例中,与癌症相关的碳水化合物抗原是Tn抗原($\text{GalNAc}\alpha\text{-Ser/Thr}$; 见Ju等人(2008) *CANCER RES.* 68 (6):1636-46)。在一些实施例中,与癌症相关的碳水化合物抗原是STn抗原($\text{NeuAc}\alpha 6\text{GalNAc}\alpha\text{-Ser/Thr}$; Ju等人(2008))。

[0182] 表4. 示例性靶向分子

[0183]

SS-14 (生长抑素类似物)	Ala-Gly-环(Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)	SEQ ID NO: 64
OC (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-Phe3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8	SEQ ID NO: 65
TOC (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8	SEQ ID NO: 66
TATE (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8	SEQ ID NO: 67
NOC (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8	SEQ ID NO: 68
NOC-ATE (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8	SEQ ID NO: 69

[0184]

BOC (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8	SEQ ID NO: 70
BOC-ATE (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8	SEQ ID NO: 71
KE108 (生长抑素类似物)	Tyr-环(DAB-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe)	SEQ ID NO: 72
LM3 (生长抑素类似物)	p-Cl-Phe-环(D-Cys-Tyr-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys)D-Tyr-NH2	SEQ ID NO: 73
BN (铃蟾素类似物)	pGlu1-Gln2-Arg3-Leu4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH2	SEQ ID NO: 74
RP527 (铃蟾素类似物)	N3S-Gly-5-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH2]	SEQ ID NO: 75
迪莫素(demobesin) 1 (铃蟾素类似物)	N40-1-bz1g0[D-Phe6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu-NHEt13]	SEQ ID NO: 76
迪莫素4 (铃蟾素类似物)	N4-[Pro1-Gln2-Arg3-Tyr4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Nle14-NH2]	SEQ ID NO: 77

[0185]

BBS-38 (铃蟾素类似物)	(N α His)Ac- β -Ala- β -Ala-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Cha13-Nle14-NH2]	SEQ ID NO: 78
BAY 86-4367 (铃蟾素类似物)	3-氰基-4-三甲铵-苯甲酰基-Ala(SO ₃ H)-Ala(SO ₃ H)-Ava[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-NMeGly11-His12-Sta13-Leu14-NH2]	SEQ ID NO: 79
MG (微小胃泌素类似物)	Leu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH2	SEQ ID NO: 80
MGO (微小胃泌素类似物)	D-Glu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH2	SEQ ID NO: 81
MG11 (微小胃泌素类似物)	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2	SEQ ID NO: 82
H2-Met (微小胃泌素类似物)	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2	SEQ ID NO: 83
H2-Nle (微小胃泌素类似物)	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2	SEQ ID NO: 84
拟胃泌素 (demogastrin, 微小胃泌素类似物)	N4-D-Glu-(Glu)5-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2	SEQ ID NO: 85

[0186]

环-MG1 (微小胃泌素类似物)	c(γ -D-Glu-Ala-Tyr-D-Lys)-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	SEQ ID NO: 86
MGD5 (微小胃泌素类似物)	Gly-Ser-Cys(琥珀酰亚氨基丙酰基-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂)-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂	SEQ ID NO: 87
布舍瑞林(buserelin, GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu)6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC ₂ H ₅	SEQ ID NO: 88
戈舍瑞林(goserelin, GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu)6-Leu7-Arg8-Pro9-AzGly10-NH ₂	SEQ ID NO: 89
柳培林(leuprolide, GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Leu6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC ₂ H ₅	SEQ ID NO: 90
那法瑞林(nafarelin, GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Nal(2)6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC ₂ H ₅	SEQ ID NO: 91
曲普瑞林(triptorelin, GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Trp6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly10-NH ₂	SEQ ID NO: 92
阿巴瑞克(abarelix, GnRH类似物)	Ac-D-Ala1-D-Cpa2-D-Ala3-Ser4-Tyr5-D-Asp6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH ₂	SEQ ID NO: 93

[0187]

阿西林(acyline, GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Aph(Ac)5-D-Aph(Ac)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2	SEQ ID NO: 94
安雷利克斯(antarelix, GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Tyr5-D-Hci6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2	SEQ ID NO: 95
安肽(antide, GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Lys(Nic)5-D-Lys(Nic)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2	SEQ ID NO: 96
阿察林B (azaline B, GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Aph(Atz)5-D-Aph(Atz)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2	SEQ ID NO: 97
西曲瑞克(cetrorelix, GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Tyr5-D-Cit6-Leu7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2	SEQ ID NO: 98
地加瑞克(degarelix, GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Aph(L-氢化乳清酰基)5-D-Aph(胺甲酰基)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2	SEQ ID NO: 99

[0188]

加尼瑞克(ganirelix, GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D- Pa13-Ser4-Tyr5-D- hArg(Et2)6-Leu7- hArg(Et2) 8-Pro9-D- Ala10-NH2	SEQ ID NO: 100
奥扎瑞克(ozarelix, GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D- Pa13-Ser4-N-MeTyr5- D-hCit6-Nle7-Arg8- Pro9-D-Ala10-NH2	SEQ ID NO: 101

[0189] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是癌胚抗原(CEA)。在一些实施例中,特异性剂包含抗CEA抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段,其包含对应于抗CEA人源化MN14(hMN14)抗体的重链及轻链可变区(参见Sharkey等人(1995)CANCER RES.55(23增刊):5935,及美国专利申请案公开案第2002/0165360号中所述的可变序列,其各自的内容是以引用方式并入本文中)。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是CEA,且该癌症选自:结肠癌、直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌及肺癌。

[0190] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是前列腺特异性膜抗原(PSMA)。在一些实施例中,特异性剂包含抗PSMA抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段,其包含如PCT公开案第W0 2016/145139号中所述的轻链及重链可变域氨基酸序列,该案的内容是以引用方式并入本文中。在一些实施例中,特异性剂包含抗PSMA抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段,其包含如SEQ ID NO:50中所述的轻链可变氨基酸序列及如SEQ ID NO:49中所述的重链可变域氨基酸序列。在一些实施例中,特异性剂包含DUPA。在一些实施例中,特异性剂包含如美国专利申请案公开案第US 2010/0324008号中所揭示的PSMA结合配体,该案以引用方式并入本文中。

[0191]

抗PSMA重链可变域	抗PSMA轻链可变域
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQDGSEKYYVDSV KGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVWDYYYDSS GDAFDIWGQGTMVTVSS SEQ ID NO: 49	VIWMTQSPSSVSASVGDRVTITC RASQGISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLSQGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA NSFPLTFGGGGTKVDIK SEQ ID NO: 50

[0192] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是PSMA,且该癌症选自:前列腺癌、子宫内膜癌、乳腺癌、肾癌及结肠癌。

[0193] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是白细胞介素13受体(IL-13R)。在一些实施例中,特异性剂包含抗IL-13R抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,特异性剂包含结合至IL13R的试剂,例如结合至IL13R(SEQ ID NO:51)的IL13配体域。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是IL13R,且该癌症是乳腺癌或恶性神经胶质瘤。

[0194]

IL13R氨基酸序列	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEI VDPGYLGYYLQWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGS ETWKTITKNLHYKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNG SEVQSSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNWQYL LCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIKA DGQNIGCRFPYLEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFT FQLQNIVKPLPPVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNETRQLCFVVR SKVNIYCSDDGIWSEWSDKQCWEGEDLSKKTLLRFWL PFGFILILVIFVTGLLLRKPNTYPMIPEFFCDT (SEQ ID NO: 51)
------------	--

[0195] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是分化簇19(CD19)。在一些实施例中,特异性剂包含抗CD19抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是CD19,且该癌症选自:急性淋巴母细胞性淋巴瘤(ALL)、非霍奇金氏淋巴瘤、肺癌及慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0196] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是人类表皮生长因子受体2(HER2;也称为ErbB-2)。在一些实施例中,特异性剂包含抗HER2抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是HER2,且该癌症选自:卵巢癌、胃癌、子宫癌及乳腺癌。

[0197] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是表皮生长因子受体(EGFR)。在一些实施例中,特异性剂包含抗EGFR抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是EGFR,且该癌症选自:非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠癌、直肠癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、乳腺癌及胰腺癌。

[0198] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是IL13R,例如乳腺癌或恶性神经胶质瘤。

[0199] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)。在一些实施例中,特异性剂包含抗VEGFR2抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段,其包含对应于抗VEGFR2人类VK-B8抗体的重链及轻链可变区(参见PCT公开案第W0 2013/149219号,该方案的内容是以引用方式并入本文中)。在一些实施例中,特异性剂包含抗VEGFR2抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段,其包含如SEQ ID NO:52中所述的轻链可变氨基酸序列及如SEQ ID NO:53中所述的重链可变域氨基酸序列。

[0200]

抗VEGFR2 VK-B8重链可变域	抗VEGFR2 VK-B8轻链可变域
MAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS	ETTLTQSPATLSVSPGERATVSCRA
CKAYGGTFTGSYGVSWVRRAPGQG	SQSLGSLNLGWFQQKPGQAPRLLIYG
LEWMGRLIPIFGTRDYAQKFQGRV	ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISS
TLTADESTNTAYMELSSLRSEDTA	LQSEDFAVYFCQQYNDWPITFGQG
VYYCARDGDYYGSGSYYGMDVW	TRLEIK (SEQ ID NO: 52)
GQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 53)	

[0201] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是VEGFR2,且该癌症选自:肾细胞癌、卵巢癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、结肠癌、直肠癌、头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、乳腺癌、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤及胰腺癌。

[0202] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是神经节苷脂GD3 (GD3)。在一些实施例中,特异性剂包含抗神经节苷脂GD3抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段,其包含对应于抗GD3抗体MB3.6的重链及轻链可变区(可变氨基酸序列参见美国专利申请案公开案第2007/0031438号,其是以引用方式并入本文中)。

[0203] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是c-型凝集素样分子1 (CLL1)。在一些实施例中,特异性剂包含抗CLL1抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,特异性剂包含结合至CLL1的试剂。

[0204] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是胆囊收缩素B受体 (CCKBR)。在一些实施例中,特异性剂包含抗CCKBR抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,特异性剂包含结合至CCKBR的试剂。在一些实施例中,特异性剂包含CCKBR拮抗剂。在一些实施例中,特异性剂包含五肽胃泌素。在一些实施例中,特异性剂包含微小胃泌素。在一些实施例中,特异性剂包含微小胃泌素类似物。在一些实施例中,微小胃泌素类似物选自:MG (SEQ ID NO:80)、MG0 (SEQ ID NO:81)、MG11 (SEQ ID NO:82)、H2-Met (SEQ ID NO:83)、H2N1e (SEQ ID NO:84)、拟胃泌素 (SEQ ID NO:85)、环-MG-1 (SEQ ID NO:86) 及MGD5 (SEQ ID NO:87)。

[0205] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是促性腺激素释放激素受体 (GnRHR)。在一些实施例中,特异性剂包含抗GnRHR抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,特异性剂包含促性腺激素释放激素 (GnRH)。在一些实施例中,特异性剂包含GnRH类似物。在一些实施例中,GnRH类似物选自:布舍瑞林 (SEQ ID NO:88)、戈舍瑞林 (SEQ ID NO:89)、柳培林 (SEQ ID NO:90)、那法瑞林 (SEQ ID NO:91)、曲普瑞林 (SEQ ID NO:92)、阿巴瑞克 (SEQ ID NO:93)、阿西林 (SEQ ID NO:94)、安雷利克斯 (SEQ ID NO:95)、安肽 (SEQ ID NO:96)、阿察林B (SEQ ID NO:97)、西曲瑞克 (SEQ ID NO:98)、地加瑞克 (SEQ ID NO:99)、加尼瑞克 (SEQ ID NO:100) 及奥扎瑞克 (SEQ ID NO:101)。在一些实施例中,特异性剂包含曲普瑞林。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是GnRHR,且该癌症选自:卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、黑色素瘤、神经胶质细胞瘤、肺癌及胰腺癌。

[0206] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是生长抑素受体2 (SSRT2)。在一些实施例中,特异性剂包含抗SSRT2抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,特异性

剂包含奥曲肽酸盐(octreotate)。在一些实施例中,特异性剂包含奥曲肽(octreotide)。在一些实施例中,特异性剂包含生长抑素类似物。在一些实施例中,生长抑素类似物选自:SS-14 (SEQ ID NO:64)、OC (SEQ ID NO:65)、TOC (SEQ ID NO:66)、TATE (SEQ ID NO:67)、NOC (SEQ ID NO:68)、NOC-ATE (SEQ ID NO:69)、BOC (SEQ ID NO:70)、BOC-ATE (SEQ ID NO:71)、KE108 (SEQ ID NO:72) 及LM3 (SEQ ID NO:73)。在一些实施例中,特异性剂包含[Tyr3]-奥曲肽酸盐。在一些实施例中,特异性剂包含如美国专利申请案公开案第2004/0044177号中所述的SSRT2结合肽,其是以引用方式并入本文中。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是SSRT2,且该癌症选自:神经内分泌癌、胃肠胰腺癌、胰腺癌、肺癌、类癌、结肠直肠癌、头颈癌、肝癌、黑色素瘤、胃癌、甲状腺癌、尿路上皮癌、子宫内膜癌及乳腺癌。

[0207] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白。在一些实施例中,特异性剂包含抗 $\alpha_v\beta_3$ 抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,特异性剂包含环状精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽(cRGD)。

[0208] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是胃泌素释放肽受体(GRPR)。在一些实施例中,特异性剂包含抗GRPR抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,特异性剂包含铃蟾素。在一些实施例中,特异性剂包含铃蟾素类似物。在一些实施例中,铃蟾素类似物选自:BN (SEQ ID NO:74)、RP527 (SEQ ID NO:75)、迪莫素1 (SEQ ID NO:76)、迪莫素4 (SEQ ID NO:77)、BBS-38 (SEQ ID NO:78) 及BAY 86-4367 (SEQ ID NO:79)。

[0209] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是神经激肽1受体(NK1R)。在一些实施例中,特异性剂包含抗NK1R抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。

[0210] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是黑皮质素1受体(MC1R)。在一些实施例中,特异性剂包含抗MC1R抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。

[0211] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是神经调压素受体1(NTSR1)。在一些实施例中,特异性剂包含抗NTSR1抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。

[0212] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是神经肽Y受体(例如, Y_1 、 Y_2 、 Y_4 及 Y_5)。在一些实施例中,特异性剂包含抗神经肽Y受体抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段(例如,抗 Y_1 、抗 Y_2 、抗 Y_4 或抗 Y_5 抗体或其抗原结合片段)。

[0213] 在一些实施例中,癌症相关蛋白质是叶酸盐受体。在一些实施例中,特异性剂包含抗叶酸盐受体抗体或其抗原结合片段,例如scFv或Fab片段。在一些实施例中,特异性剂包含叶酸盐。在一些实施例中,特异性剂包含结合叶酸盐受体的抗叶酸剂如国际公开案第W0 2010/033733号中所述,其是以引用方式并入本文中。在一些实施例中,癌症相关蛋白质是叶酸盐受体,且该癌症选自:非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌、卵巢癌、肾癌、胃癌及乳腺癌。

[0214] 在一些实施例中,特异性剂结合至来自致病性生物体的蛋白质(例如,朊蛋白、病毒、原生动物、寄生虫、真菌及细菌)。在一些实施例中,特异性剂包含抗体或其抗原结合片段,其特异性结合至来自致病性生物体的蛋白质。在一些实施例中,特异性剂结合至病毒蛋白。在一些实施例中,特异性剂结合至HIV蛋白。在一些实施例中,特异性剂结合至细菌蛋白质。在一些实施例中,特异性剂结合至真菌蛋白质。在一些实施例中,特异性剂结合至寄生虫蛋白质。在一些实施例中,特异性剂结合至原生动物蛋白质。

[0215] 用于本发明中的特异性剂经由反应性部分偶联至本文所揭示的PUCRs的催化性抗

体。在一些实施例中,特异性剂包含与本发明PUCR的催化性抗体区的反应性氨基酸残基反应的反应性部分。本领域技术人员将易于了解用于本发明中的反应性部分。在一些实施例中,反应性部分是选自以下的化学基团:酮、二酮、 β 内酰胺、活性酯卤代酮、内酯、酸酐、马来酰亚胺、环氧化物、醛脒、胍、亚胺、烯胺、磷酸酯、膦酸酯、环氧化物、氮丙啶、硫代环氧化物、经遮蔽或经保护二酮(例如,缩酮)、内酰胺、卤代酮、醛、及诸如此类。在一些实施例中,反应性部分包含含马来酰亚胺组分或其他硫醇反应性基团(例如碘乙酰胺、芳基卤化物、二硫氢基及诸如此类)。在一些实施例中,反应性部分是二酮。在其他实施例中,反应性部分是氮杂环丁酮。在一些实施例中,反应性部分是N-磺酰基- β -内酰胺。

[0216] 在一些实施例中,特异性剂包含连接体。不希望受限于任何具体理论,在一些实施例中,特异性剂包含不干扰包含特异性剂所附接的PUCR的宿主细胞的活化的连接体。在一些实施例中,连接体是柔性连接体。在一些实施例中,连接体是非柔性连接体。在一些实施例中,连接体是可裂解连接体。在一些实施例中,连接体是可水解连接体。在一些实施例中,连接体是不可裂解连接体。在一些实施例中,连接体包含小分子。在一些实施例中,连接体包含肽。在一些实施例中,连接体包含非肽连接体。在一些实施例中,非肽连接体是烷基连接体。示例性非肽连接体是聚乙二醇(PEG)连接体。在一些实施例中,连接体包含烃、肽、聚醚、聚乙二醇或其他键联及/或聚合物间隔体。在一些实施例中,连接体包含(PEG)_n,其中n可为介于1与50之间的整数,包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、27、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或更大。在一些实施例中,连接体包含(PEG)_n,其中n是5或13。在一些实施例中,连接体包含(PEG)_n,其中n是24或48。在一些实施例中,连接体具有100至5000kDa、优选100至500kDa的分子量。肽连接体可经改变以形成衍生物。本文所述的任何连接体可用于将反应性部分偶联至特异性剂。用于本发明中的其他连接体为本领域已知且将易于为本领域技术人员所了解(例如,参见美国专利第5,122,368号、第5,824,805号及第8,309,093号;及美国专利申请公开案第2006/0024317号、第2003/0083263号、第2005/0238649号及第2005/0009751号;其内容是以引用方式并入本文中,且具体而言,揭示内容是关于连接体)。

[0217] D. 连接体

[0218] 在本发明的另一方面中,本文所述PUCRs可偶联至包含至少一个反应性部分的连接体。在一些实施例中,连接体进一步包含可与特异性剂反应以将特异性剂附接至PUCR,由此使PUCR程序化的偶联官能团。在一些实施例中,特异性剂经由偶联官能团偶联至本文所揭示的连接体。在一些实施例中,PUCR经由反应性氨基酸残基偶联至包含反应性部分的连接体。

[0219] 连接体可包含本文所述的任何反应性部分。在一些实施例中,反应性部分共价结合至PUCR的反应性氨基酸残基。在一些实施例中,反应性部分共价结合至PUCR的反应性氨基酸残基的侧链。在一些实施例中,反应性部分非共价结合至PUCR的反应性氨基酸残基。在一些实施例中,反应性部分是选自以下的化学基团:酮、二酮、 β 内酰胺、活性酯卤代酮、内酯、酸酐、马来酰亚胺、环氧化物、醛脒、胍、亚胺、烯胺、磷酸酯、膦酸酯、环氧化物、氮丙啶、硫代环氧化物、经遮蔽或经保护二酮(例如,缩酮)、内酰胺、卤代酮、醛、及诸如此类。举例而言,在PUCR包含醛缩酶抗体或其催化性部分(例如,鼠类或人源化38C2)时,连接体可经由二酮或氮杂环丁酮反应性部分偶联至反应性赖氨酸(例如,Lys93)。此外,在PUCR包含硫酯酶

抗体或其催化性部分时,连接体可经由包含马来酰亚胺组分或其他硫醇反应性基团(例如碘乙酰胺、芳基卤化物、二巯氢基及诸如此类)的反应性部分偶联至反应性半胱氨酸。在一些实施例中,连接体的反应性部分是二酮。在其他实施例中,连接体的反应性部分是氮杂环丁酮。在一些实施例中,连接体的反应性部分是N-磺酰基- β -内酰胺。

[0220] 在一些实施例中,连接体包含偶联官能团。在一些实施例中,连接体包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个偶联官能团。在一些实施例中,偶联官能团包含能经由点击化学反应与存于特异性剂上的第二化学部分反应的第一化学部分。点击化学反应是在一对末端反应性部分之间进行的化学反应,其中,末端反应性部分快速且选择性彼此反应(“点击”)以形成靶向或效应物部分偶联的结合多肽。在一些实施例中,点击化学反应是由铜(Cu(I))催化。在一些实施例中,点击化学反应不需要铜催化剂。在一些实施例中,偶联官能团包含正交反应性官能团。在这些实施例中,连接体的偶联官能团能与存于特异性剂上的相容性正交官能团反应。多个正交反应性官能团及其能与之反应的正交官能团为本领域已知且可用于本文所述方法中(例如,参见Lang及Chin (2014) CHEM. REV. 114: 4764-4806; 及Lang及Chin (2014) ACS CHEM. BIOL. 9: 16-20)。正交官能团包括(但不限于): 醛、酮、氨基氧基、肼、硒基取代、二苯并环辛基、反式-环辛烯、炔烃、叠氮化物、四嗪、烯烃等。合适正交官能团的这样的反应表示为但不限于: 酮/烷氧基胺缩合、醛/烷氧基胺缩合、Diels-Alder环加成、Staudinger连接、交叉歧化、Pd催化的交叉偶合、应变促进的炔烃-叠氮化物环加成、应变促进的炔烃-硝酮环加成、铜催化的炔烃-叠氮化物环加成、光点击环加成及1,2-氨基硫醇-CBT缩合。正交基团也包括酶基质。

[0221] 在一些实施例中,连接体是柔性连接体。在一些实施例中,连接体是非柔性连接体。在一些实施例中,连接体是可裂解连接体。在一些实施例中,连接体是可水解连接体。在一些实施例中,连接体是不可裂解连接体。在一些实施例中,连接体包含小分子。在一些实施例中,连接体包含肽。在一些实施例中,连接体包含非肽连接体。在一些实施例中,连接体包含烃、肽、聚酯、聚乙二醇或其他键联及/或聚合物间隔体。示例性非肽连接体是聚乙二醇(PEG)连接体。在一些实施例中,连接体包含(PEG)_n, 其中n可为介于1与50之间的整数,包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、27、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或更大。在一些实施例中,连接体包含(PEG)_n, 其中n是5或13。在一些实施例中,连接体包含(PEG)_n, 其中n是24或48。在一些实施例中,连接体具有100至5000kDa、优选100至500kDa的分子量。

[0222] 在一些实施例中,连接体采用“C-锁”偶联方法及连接体化学。此化学在二硫键还原后重新连接先前通过二硫键结合的多肽(例如,抗体重链及轻链)。交联在每个断裂二硫键引入1个连接体。在一些实施例中,偶联是使用可与抗体上的个别硫氢基反应的马来酰亚胺基或乙烯基部分经由Michael加成反应完成。游离硫氢基可通过还原抗体中的二硫键来形成。经由半胱氨酸提供偶联且不降低结构稳定性的合适组合物及方法揭示于W0 2013/173391中,其是全文以引用方式并入。

[0223] 在一些实施例中,连接体采用靶向存于多肽中的赖氨酸残基的“K-锁”位点选择性偶联技术。举例而言,在特异性剂是抗体时,“K-锁”位点选择性偶联技术靶向80-90个存于抗体中的Lys中的2个天然Lys位点,且无需使用细胞改造或酶修饰步骤修饰抗体。在一些实施例中,偶联是通过与赖氨酸侧链形成酰胺键来完成,如例如W0 2013/173392及W0 2013/

173393中所揭示,其是全文以引用方式并入。在一些实施例中,连接体附接至包含可变 κ 轻链的特异性剂(例如,抗体或其抗原结合片段)。在一些实施例中,连接体附接至可变 κ 轻链的赖氨酸(例如,根据Kabat编号对应于Lys188的赖氨酸)。

[0224] 在一些实施例中,连接体是二酮-PEG5-PFP酯(3-[2-[2-[2-[2-[3-[4-(3,5-二氧代己基)苯氨基]-3-氧代-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸(2,3,4,5,6-五氟苯基)酯,在本文中也称为DK-PEG5-PFP酯)。在一些实施例中,连接体是氮杂环丁酮-PEG13-PFP酯(3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-氧代-3-[4-[3-氧代-3-(2-氧代氮杂环丁-1-基)丙基]苯氨基]丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸(2,3,4,5,6-五氟苯基)酯,在本文中也称为AZD-PEG5-PFP酯。

[0225] C. 可检测部分

[0226] 在一些实施例中,本发明的PUCR及/或特异性剂及/或连接体包含可检测部分。在一些实施例中,可检测部分共价附接至PUCR。在一些实施例中,可检测部分共价附接至特异性剂。在一些实施例中,可检测部分非共价附接至PUCR。在一些实施例中,可检测部分提供检测或量化包含可检测部分的PUCR及/或特异性剂的方式。在一些实施例中,可检测部分提供测定特异性剂与本发明PUCR偶联的效率的方式。

[0227] 在一些实施例中,可检测部分是多肽(例如,GST-标签、His-标签、myc-标签或HA-标签、荧光蛋白(例如,GFP或YFP))。在一些实施例中,可检测部分是放射性部分、荧光部分、化学发光部分、质量标记、电荷标记或酶(例如,对于其观察到该酶的基质转化活性可揭露可程序化通用嵌合受体及/或特异性剂的存在)。在一些实施例中,可检测部分是生物素。

[0228] 在一些实施例中,可检测部分附接至可程序化的通用细胞受体的N末端。在一些实施例中,可检测部分附接至特异性剂的N末端。在一些实施例中,可检测部分附接至可程序化的通用细胞受体的C末端。在一些实施例中,可检测部分附接至特异性剂的C末端。

[0229] 在一些实施例中,可程序化的通用细胞受体及/或特异性剂包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个可检测部分。

[0230] 在一些实施例中,可检测部分可裂解。在其他实施例中,可检测部分不可裂解。在一些实施例中,可检测部分经由连接体附接至可程序化的通用细胞受体及/或特异性剂。在一些实施例中,连接体可裂解。在其他实施例中,连接体不可裂解。用于可检测部分的连接体可为本文所述的任何连接体,或本领域技术人员易于了解的任何连接体。

[0231] 编码本文所述PUCR的任何核酸可通过常规方法、例如重组体技术来制备。用于制备本文所述PUCR的方法涉及生成编码包含PUCRs的每一域(包括催化性抗体区、跨膜域及细胞内域)的多肽的核酸。在一些实施例中,核酸编码包含信号传导域的细胞内域。在一些实施例中,核酸编码包含共刺激信号传导域的细胞内域。在一些实施例中,核酸编码PUCR的催化性抗体区与跨膜域之间的铰链区。编码嵌合受体的核酸也可编码信号序列。

[0232] 本文所揭示的PUCRs的每一组分的序列可经由常规技术获得,例如自本领域已知多种来源中的任一者PCR扩增。在一些实施例中,PUCRs中一种或多种组分的序列是自哺乳动物细胞(例如,鼠类细胞或人类细胞)获得。或者,PUCRs中一种或多种组分的序列可经合成。每一组分(例如,域)的序列可使用诸如PCR扩增或连接等方法直接或间接(例如,使用编码肽连接体的核酸序列)接合以形成编码PUCR的核酸序列。或者,编码PUCR的核酸可经合

成。在一些实施例中,核酸是DNA。在其他实施例中,核酸是RNA(例如,mRNA)。

[0233] 在其他实施例中,也涵盖由本文所揭示的核酸分子中的任一者编码的经分离多肽分子。纯化并分离这样的多肽的方法为本领域所熟知(例如,参见Sambrook等人(2012) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY)。

[0234] D. 宿主细胞

[0235] 表达本文所述PUCRs的经分离的宿主细胞也涵盖于本发明中。在一些实施例中,宿主细胞是免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性球、嗜酸性粒细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T细胞或其任一组合)。在一些实施例中,经分离的宿主细胞是T细胞。在一些实施例中,经分离的宿主细胞是NK细胞。在其他实施例中,经分离的宿主细胞是已确立细胞系,例如NK-92细胞。在一些实施例中,经分离的宿主细胞是经修饰的NK-92细胞(ATCC寄存号PTA-6672)。在一些实施例中,宿主细胞是KHYG-1自然杀伤细胞。在一些实施例中,宿主细胞是NKL自然杀伤细胞。在一个实施例中,宿主细胞是胎盘NK细胞。

[0236] 在一些实施例中,经分离的宿主细胞是免疫细胞。免疫细胞群可来自任何来源,例如末梢血单核细胞(PBMC)、骨髓、诸如脾、淋巴结、胸腺或肿瘤组织等组织。适于获得期望宿主细胞类型的来源将为本领域技术人员显而易见。在一些实施例中,免疫细胞群源自PBMCs。

[0237] 制备表达本发明PUCR的宿主细胞的方法可包含离体扩增经分离的宿主细胞。扩增宿主细胞可涉及导致表现PUCR的细胞数增加的任何方法,例如使宿主细胞增殖或刺激宿主细胞增殖。刺激宿主细胞扩增的方法将取决于用于表达嵌合受体的宿主细胞的类型且将为本领域技术人员显而易见。在一些实施例中,表达本发明PUCR的宿主细胞是在施用至个体之前离体扩增。

[0238] 制备表现本文所述PUCRs中任一者的宿主细胞的方法也可包含离体活化经分离的宿主细胞(例如,T细胞)。活化宿主细胞意指刺激宿主细胞进入活性状态,其中该细胞可能实施效应功能(例如,细胞毒性功能)。活化宿主细胞的方法将取决于用于表达PUCR的宿主细胞的类型。举例而言,T细胞可在一种或多种分子(例如抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2或植物性血球凝集素)存在下离体活化。在其他实例中,NK细胞可在一种或多种分子(例如4-1BB配体、抗4-1BB抗体、IL-15、抗IL-15受体抗体、IL-2、IL12、IL-21及K562细胞)存在下离体活化。在一些实施例中,表达本文所述PUCRs中任一者的宿主细胞是在施用至个体之前离体活化。确定宿主细胞是否经活化将为本领域技术人员显而易见且可包括评价一种或多种与细胞活化、细胞因子的表达或分泌及细胞形态相关的细胞表面标记物的表达。

[0239] 为产生表达本文所揭示PUCR的经分离的宿主细胞,可经由传统方法构筑用于稳定或瞬时表达PUCR的表达载体并引入经分离的宿主细胞中。举例而言,可将编码PUCR的核酸(例如,DNA或mRNA)克隆至合适的表达载体中,例如与合适启动子可操作连接的病毒载体。在一些实施例中,启动子是诱导型启动子。在一些实施例中,启动子是组成型启动子。在一些实施例中,启动子具有组织特异性。在一些实施例中,启动子具有细胞特异性。可向细胞提供呈病毒载体形式的表达载体。病毒载体技术为本领域所熟知且阐述于例如以下文献中:Sambrook等人(2012) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY,及其他病毒学及分子生物学手册中。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、疱疹病毒及慢病毒。一般而言,合适的载体含有

在至少一种生物体中发挥功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点及一个或多个可选择标记物(例如,如PCT申请案第W0 01/96584号、第W0 01/29058号及美国专利第6,326,193号中所揭示)。适用于产生含有转基因的载体的载体及方法为本领域所熟知且可获得。在一些实施例中,载体是病毒载体。在一些实施例中,病毒载体选自:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体及腺相关载体。在一些实施例中,载体是基于鼠类白血病病毒(MLV)的逆转录病毒载体(例如,参见Kim等人(1998) J VIROL. 72 (2):994-1004,其是以引用方式并入本文中)。在一些实施例中,载体是基于莫罗尼鼠类白血病病毒(MoMuLV)的逆转录病毒载体。

[0240] 可使用多种启动子表达本文所述PUCR,包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、病毒LTR(例如劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)LTR、HIV-LTR、HTLV-1LTR)、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、单纯疱疹tk病毒启动子。用于表达PUCR的其他启动子包括哺乳动物细胞(例如,免疫细胞)中的任何组成型活性启动子。或者,可使用任何可调节启动子,使得可调节其在宿主细胞内的表达。

[0241] 用于本发明中的载体可含有例如以下中的一或多个者:可选标记物基因(例如,用于稳定或瞬时转染体的选择的新霉素基因);来自人类CMV的立即早期基因的、用于高转录程度的增强子/启动子序列;来自SV40的、用于mRNA稳定性的转录终止及RNA处理信号;用于适当游离型复制的SV40多瘤复制起点及ColE1;内部核糖体结合位点(IRES)、通用多克隆位点;用于有义及反义RNA的活体外转录的T7及SP6RNA启动子;在触发时引起携载载体的细胞死亡的“自杀开关”或“自杀基因”(例如,HSV胸苷激酶、诱导型半胱天冬酶,例如iCasp9);及用于评价PUCR的表达的报导基因。

[0242] 将编码PUCR的核酸(例如,载体)递送至宿主细胞的方法为本领域所熟知。可使用多种不同方法中的任一者将编码PUCR的核酸(例如,DNA或mRNA)引入宿主细胞中,例如市售方法,其包括(但不限于)电穿孔(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems)、ECM 830(BTX)(Harvard Instruments)或Gene Pulser II(BioRad)、Multiporator(Eppendorf))、使用脂转染的阳离子脂质体介导的转染、聚合物囊封、肽介导的转染或生物弹道学颗粒递送系统(例如“基因枪”)(例如,参见Nishikawa等人(2001) HUM GENE THER. 12 (8):861-70。

[0243] 用于将多核苷酸引入宿主细胞中的化学方式包括胶质分散系统,例如大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠粒及基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束及脂质体。用作活体外及活体内递送媒介的示例性胶质系统是脂质体(例如人工膜囊泡)。可获得目前最佳技术靶向递送核酸的其他方法,例如用靶向纳米颗粒或其他合适亚微米大小的递送系统递送多核苷酸。

[0244] 在利用非病毒递送系统的情形中,示例性递送媒介是脂质体。涵盖使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞中(活体外、离体或活体内)。另一方面,核酸可与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可囊封于脂质体的水性内部,散置在脂质体的脂质双层内,经由与脂质体及寡核苷酸二者缔合的连接分子附接至脂质体,包埋于脂质体中,与脂质体复合,分散于含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合,以悬浮液形式含于脂质中,含有胶束或与其复合或以其他方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体缔合组合物并不限于溶液中的任何具体结构。举例而言,其可以双层结构、作为胶束或以“塌陷”结构存在。其也可简单地散置于溶液中,可能形成大小或形状不均匀的聚集物。脂质是可为天然脂质或合成脂质的脂肪

物质。举例而言,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、氨基醇及醛。也涵盖lipofectamine-核酸复合物。在一些实施例中,通过病毒转导将编码本发明PUCR的载体递送至宿主细胞。示例性病毒递送方法包括(但不限于)重组体逆转录病毒(例如,参见PCT公开案第W0 90/07936号、第W0 94/03622号、第W0 93/25698号、第W0 93/25234号、第W0 93/11230号、第W0 93/10218号、第W0 91/02805号;美国专利第5,219,740号及第4,777,127号;GB专利第2,200,651号;及EP专利第0 345 242号)、基于 α 病毒的载体及腺相关病毒(AAV)载体(例如,参见PCT公开案第W0 94/12649号、第W0 93/03769号、第W0 93/19191号、第W0 94/28938号、第W0 95/11984号及第W0 95/00655号)。

[0245] 在一些方面中,可使用非病毒方法将编码本文所述PUCR的核酸递送至细胞或组织或个体中。在一些实施例中,非病毒方法包括使用转座子(也称为转座因子)。在一些实施例中,转座子是一段可将自身插入基因组中一位置的DNA,例如一段能够自我复制且将其拷贝插入基因组中的DNA,或一段可从较长核酸剪接出来且插入基因组中的另一位置中的DNA。举例而言,转座子包含由反向重复序列侧接基因构成的DNA序列用于转位。

[0246] 利用转座子的示例性核酸递送方法包括睡美人转座子系统(SBTS)及piggyBac(PB)转座子系统。例如,参见Aronovich等人(2011)HUM.MOL.GENET.20:R14-R20;Singh等人(2008)CANCER RES.15:2961-2971;Huang等人(2008)MOL.THER.16:580-589;Grabundzija等人(2010)MOL.THER.18:1200-1209;Kebriaei等人(2013)BLOOD.122:166;Williams(2008)Molecular Therapy 16:1515-16;Bell等人(2007)NAT.PROTOC.2:3153-65;及Ding等人(2005)CELL 122:473-83,其各自的内容是以引用方式并入本文中。SBTS包括两种组分:1)含有转基因的转座子及2)转座酶的来源。转座酶可将转座子自载体质体(或其他供体DNA)转位至靶DNA,例如宿主细胞染色体/基因组。举例而言,转座酶结合至载体质体/供体DNA,自质体切割出转座子(包括转基因),并将其插入宿主细胞的基因组中。例如,参见Aronovich等人(2011)。使用SBTS允许整合并表达转基因,例如编码本文所述PUCR的核酸。本文提供例如使用转座子系统(例如SBTS)生成稳定表达本文所述PUCR的细胞(例如,T细胞或NK细胞)的方法。

[0247] 示例性转座子包括基于pT2的转座子。例如,参见Grabundzija等人(2013)NUCLEIC ACIDS RES.41:1829-47;及Singh等人(2008)CANCER RES.68:2961-71,其各自的内容是以引用方式并入本文中。示例性转座酶包括Tc1/水手(mariner)型转座酶,例如SB10转座酶或SB11转座酶(可自例如巨细胞病毒启动子表达的活性过强的转座酶)。

[0248] 在一些实施例中,表达本文所述PUCR的细胞(例如,T细胞或NK细胞)是通过使用使用SBTS的基因插入与使用核酸酶(例如,锌指核酸酶(ZFN)、转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)、CRISPR/Cas系统或经改造大范围核酸酶重改造的归巢核酸内切酶)的遗传编辑的组合来生成。

[0249] 本发明中包括的经分离的宿主细胞可表达多于一种类型的PUCR(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种类型的PUCR)。因此,在本发明的一些实施例中,经分离的宿主细胞可表达一种类型的PUCR。在一些实施例中,本发明的经分离的宿主细胞可表达两种类型的PUCR。在本发明的一些实施例中,经分离的宿主细胞可表达3种类型的PUCR。在本发明的一些实施例中,经分离的宿主细胞可表达4种类型的PUCR。在本发明的一些实施例中,经分离

的宿主细胞可表达5种类型的PUCR。在本发明的一些实施例中,经分离的宿主细胞可表达6种类型的PUCR。表达多于一种类型的PUCR可尤其有利于治疗性目的。举例而言,在一个实施例中,本发明宿主细胞可表达包含来自活化受体蛋白质的共刺激域的PUCR及包含来自抑制性受体蛋白质的共刺激域的PUCR。该PUCR可各自进一步经程序化(例如,偶联)至不同配体。举例而言,在一个实施例中,宿主细胞可包含经结合至癌症相关蛋白质的特异性剂程序化(即,偶联)的、包含来自活化受体(例如,DAP10)的共刺激信号传导域的PUCR及经结合在正常细胞(例如,非癌细胞)表面上不存在或存在极少的配体的特异性剂程序化(即,偶联)的、包含来自抑制性受体(例如,CD94/NKG2A)的共刺激信号传导域的第二PUCR。在宿主细胞中表达该PUCR的二者时,可调节宿主细胞(例如,T细胞)的活化,使得该T细胞未活化,或在其结合至正常宿主细胞时展现降低的活化。

[0250] 在本发明的一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞可用于非治疗性目的。举例而言,包含PUCR的宿主细胞可用于诊断性目的及/或可用于测定特定细胞(例如,癌细胞)是否在其表面上表达生物标记物。

[0251] 本发明的表达本文所揭示PUCR的经分离的宿主细胞可使用一种或多种特异性剂程序化。本发明的一个优点在于,表现本文所揭示PUCR的宿主细胞可经程序化以靶向一个或多个所关注配体。因此,本发明的单一宿主细胞可具有多种特异性。举例而言,在一个实施例中,包含本发明PUCR的宿主细胞包含偶联至对第一配体具有特异性的特异性剂的PUCR,且进一步包含偶联至对与第一配体不同的第二配体具有特异性的特异性剂的PUCR。在一个实施例中,该第一配体及该第二配体可为相同蛋白质的不同表位。在一些实施例中,这样的第一及第二配体可为不同蛋白质。

[0252] 在一个实施例中,包含本发明PUCR的宿主细胞包含偶联至对第一抗原具有特异性的特异性剂的PUCR及偶联至对不同于第一抗原的第二抗原具有特异性的特异性剂的PUCR。在一些实施例中,表达本文所揭示PUCR的宿主细胞可经多种特异性剂(例如,2、3、4、5、6、7或8种特异性剂)程序化。因此,单一宿主细胞可包含2、3、4、5、6、7或更多种PUCR,其中各PUCR已偶联至不同特异性剂。这些特异性剂可皆为相同类型的特异性剂或不同类型的特异性剂。举例而言,表达本文所揭示PUCR的宿主细胞可经第一特异性剂程序化,其中该第一特异性剂包含结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段);且经第二特异性剂程序化,其中该第二特异性剂包含小分子(例如,叶酸或2-[3-(1,3-二羧基丙基)-脲基]戊二酸(DUPA)。以两种或更多种特异性剂对表达本文所揭示PUCR的宿主细胞进行程序化的能力可尤其有利于治疗复杂疾病及/或医学病况,例如癌症,其中可期望使用相同的表达本文所揭示PUCR的宿主细胞(例如,免疫细胞)靶向多种配体。

[0253] 本发明的表达本文所揭示PUCR的经分离的宿主细胞可经由PUCR的反应性氨基酸残基偶联至包含反应性部分的连接体。在一些实施例中,在活体外,PUCR偶联至连接体。在一些实施例中,在活体内,PUCR偶联至连接体。然后,通过使存于连接体上的偶联官能团(例如,第一正交官能团)与存于特异性剂上的化学部分(例如,第二正交官能团)反应对PUCR进行程序化。在一些实施例中,在活体外,使特异性剂与偶联至PUCR的连接体反应。在一些实施例中,在活体外,使特异性剂与偶联至PUCR的连接体反应。

[0254] 本发明中也提供宿主细胞(例如,免疫细胞)的群,其中宿主细胞群包含a) 宿主细胞子群,其包含连接至结合至第一配体的特异性剂的PUCR,及b) 宿主细胞子群,其包含连接

至不同于第一配体的第二配体的PUCR。在一些实施例中,本发明提供宿主细胞(例如,免疫细胞)群,其中宿主细胞群包含a) 宿主细胞子群,其包含连接至结合至第一抗原的特异性剂的PUCR,及b) 宿主细胞子群,其包含连接至不同于第一抗原的第二抗原的PUCR。在一些实施例中,本发明提供宿主细胞群,其中宿主细胞群包含2、3、4、5、6、7或更多个包含PUCR的宿主细胞子群,其中各宿主细胞子群包含连接至特异性剂的PUCR,该特异性剂不同于各其他宿主细胞子群的特异性剂。

[0255] E. 试剂盒

[0256] 本发明也提供包含一种或多种本文所揭示组合物的试剂盒。本发明试剂盒包括一个或多个容器,其包含包含本文所揭示PUCR的宿主细胞群,且在一些实施例中,进一步包含根据本文所述任一方法使用的说明书。试剂盒可进一步包含适合个体的选择或治疗的选择的说明(例如特异性剂)。本发明试剂盒中供应的说明书通常是标记或包装插页(例如,试剂盒中包括的纸页)上的书面说明书,但也可接受机读说明书(例如,载于磁性或光学存储盘上的说明书)。

[0257] 在一些实施例中,试剂盒包含a) 组合物,其包含包含PUCR的宿主细胞群,其中PUCR包含含有反应性氨基酸残基的催化性抗体或其催化性部分,其中反应性氨基酸残基未结合至特异性剂;跨膜域;及细胞内域,及b) 将宿主细胞群施用至个体以供有效治疗疾病的说明书。在一些实施例中,该疾病是癌症。在其他实施例中,该疾病是由致病性生物体(例如,朊蛋白、病毒、细菌、真菌、原生动物及寄生虫)引起的医学病况。在一些实施例中,试剂盒进一步包含一种或多种特异性剂。包含PUCR及特异性剂的宿主细胞群可存于分开容器中或存于单一容器中。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^1 个宿主细胞至约 1×10^{12} 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^1 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^2 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^3 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^4 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^5 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^6 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^7 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^8 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^9 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^{10} 个宿主细胞组成。在一些实施例中,包含PUCR的宿主细胞群由约 1×10^{11} 个宿主细胞组成。在其他实施例中,试剂盒包含a) 组合物,其包含编码PUCR的核酸分子,其中PUCR包含含有反应性氨基酸残基的催化性抗体或其催化性部分、跨膜域及细胞内域;及b) 将编码PUCR的核酸分子引入经分离的宿主细胞中的说明书。

[0258] 本发明试剂盒呈合适包装。合适包装包括(但不限于)小瓶、瓶、广口瓶、柔性包装(例如,密封Mylar或塑料袋)及诸如此类。试剂盒可可选地提供额外组分,例如缓冲液及解释性信息。

[0259] 关于本文所揭示的组合物的使用的说明书包括关于用于既定治疗的剂量、投药时间表及施用途径的信息。容器可为单位剂量、散装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。

[0260] II. 本发明组合物的使用方法

[0261] 由于本文所揭示的PUCR的多样性,本发明组合物适于治疗多种医学病况及疾病。

如上文所揭示,可使用编码本发明PUCR的核酸生成经程序化以靶向任何所关注配体的经分离的宿主细胞。举例而言,在一些实施例中,宿主细胞是免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)。在这样的实施例中,本发明有利地提供可程序化免疫治疗方法,其可在可能需要时经定制化以治疗疾病。这样的可程序化免疫治疗方法尤其有利于治疗复杂疾病,例如癌症及传染病。

[0262] 本发明方法的一个特定优点在于,包含PUCR的宿主细胞群可易于使用本文所述方法产生,且储存(例如,低温保存)或在不首先经程序化(即,不首先偶联至特异性剂)的情况下施用至个体。然后可回收宿主细胞群(例如,自个体分离),随意程序化(例如,与所关注特异性剂偶联),并在可能需要时施用至个体。因此,例如,若宿主细胞是例如T细胞,则可生成包含本发明PUCR的T细胞群并施用至人类个体。不希望受限于任何具体理论,可使该包含PUCR的T细胞群在个体中倍增、扩增及/或建立,由此提供包含PUCR的T细胞的可能无限制的供应,其可回收(例如,自个体分离)且在可能需要时随意程序化。

[0263] 可在经表达嵌合抗原受体(即,CAR T细胞)的宿主细胞治疗的患者中产生的潜在问题是在经这样的细胞多次治疗后,尤其在包含非人类源蛋白质序列或区域(例如,鼠类scFv)的嵌合抗原受体中,可能发生过敏反应。人们认为,此一过敏性反应是由体液性抗CAR反应、即具有抗IgE同型的抗CAR抗体引起。不希望受限于任何具体理论,本发明方法的特定优点在于,包含本发明PUCR的宿主细胞在其所施用的个体中可不诱导体液性反应。例如,在一些实施例中,PUCR可经设计以仅包含人源化及/或人类序列。因此,在施用至个体时,包含PUCR的宿主细胞可经设计为抗原性休眠。在一些实施例中,即使这样的宿主细胞包含已经程序化(即,偶联)至包含非人类源蛋白质序列或区域的特异性剂的PUCR,这样的经程序化PUCR在将宿主细胞施用至个体的后仅暴露于个体的免疫系统有限时间长度,使得在个体中不发生有害免疫反应。此可能是由于PUCR在正常质膜再循环过程期间内化(例如,胞吞作用)或由于包含经程序化PUCR的宿主细胞死亡。

[0264] 在本发明的另一方面中,可向个体施用如本文所述的包含已与包含偶联官能团的连接体偶联的PUCR的宿主细胞群。然后可向个体施用包含能与偶联官能团反应以随意对PUCR进行程序化的化学部分的特异性剂。因此,在一些实施例中,PUCR在活体内或原位经程序化。在其他实施例中,可自个体移除包含已与连接体偶联的PUCR的宿主细胞群并用包含能与偶联官能团反应的化学部分的特异性剂离体程序化。

[0265] 一方面,本发明提供制备用于治疗有需要的个体的疾病的定制化治疗性宿主细胞的方法,该方法包含使免疫细胞与结合至在免疫细胞的细胞膜上表达的PUCR的特异性剂接触,其中该特异性剂结合至对应于有需要的个体的疾病抗原谱的疾病相关抗原。在一些实施例中,使定制化治疗性宿主细胞与结合至PUCR的特异性剂在活体内接触。在一些实施例中,使定制化治疗性宿主细胞与结合至PUCR的特异性剂在活体外接触。在一些实施例中,使定制化治疗性宿主细胞与结合至PUCR的特异性剂原位接触。也提供制备用于治疗有需要的个体的癌症的定制化治疗性宿主细胞的方法,该方法包含使免疫细胞与结合至在免疫细胞的细胞膜上表达的PUCR的特异性剂接触,其中该特异性剂结合至对应于有需要的个体的癌症抗原谱的癌症相关抗原。本发明也提供制备用于治疗有需要的个体的传染病的定制化治疗性宿主细胞的方法,该方法包含使免疫细胞与结合至在免疫细胞的细胞膜上表达的PUCR的特异性剂接触,其中该特异性剂结合至对应于有需要的个体的致病性生物体抗原谱的致

病性生物体抗原。

[0266] 一方面,本发明提供在有需要的个体中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法,该方法包含向该个体施用包含本发明PUCR的经分离的宿主细胞或该宿主细胞群。在一些实施例中,经分离的宿主细胞是免疫细胞(例如T细胞或NK细胞)。在一些实施例中,包含本发明PUCR的经分离的宿主细胞源自该个体。在一些实施例中,包含本发明PUCR的经分离的宿主细胞并非源自该个体。在一些实施例中,经分离的宿主细胞是来自已确立细胞系(例如NK-92细胞)的细胞。

[0267] 可用本发明的方法治疗本领域已知的任何癌症,包括(但不限于)前列腺癌、胆道癌、脑癌(包括神经胶质母细胞瘤及髓母细胞瘤)、乳腺癌、子宫颈癌、绒毛膜癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、血液肿瘤(包括例如急性淋巴细胞性及骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、AIDS相关白血病及成人T细胞白血病淋巴瘤)、上皮内肿瘤(包括例如波文氏病(Bowen's disease)及柏哲德氏病(Paget's disease))、肝癌、肺癌、淋巴瘤(包括例如霍奇金氏病(Hodgkin's disease)及淋巴细胞性淋巴瘤)、神经胚细胞瘤、口腔癌(包括鳞状细胞癌)、卵巢癌(包括自上皮细胞、基质细胞、生殖细胞及间叶细胞产生者)、胰腺癌、直肠癌、肉瘤(包括例如平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤及骨肉瘤)、皮肤癌(包括例如黑色素瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、基底细胞癌及鳞状细胞癌)、睾丸癌(包括例如生殖瘤(精原细胞瘤、非精原细胞瘤(畸胎瘤、绒毛膜癌)、基质瘤及生殖细胞瘤))、甲状腺癌(包括例如甲状腺腺癌及髓癌)及肾癌(包括例如腺癌及威尔姆氏瘤(Wilms tumor))。

[0268] 在一些实施例中,癌症与蛋白质的高表达程度相关。在这样的实施例中,包含本发明PUCRs的经分离的宿主细胞可经靶向(例如特异性结合至)高表达程度与癌症相关的蛋白质的特异性剂程序化(例如偶联)。在一些实施例中,高表达程度与癌症相关的蛋白质在癌细胞表面上表达。在一些实施例中,高表达程度与癌症相关的蛋白质不在癌细胞表面上表达。

[0269] 一方面,本发明提供治疗有需要的个体的癌症的方法,该方法包含:(a)测定该个体的癌症抗原谱;(b)选择结合至(a)中所鉴别的该抗原的特异性剂;及(c)施用包含结合至(例如,偶联)至(b)中所鉴别的该特异性剂的PUCR的免疫细胞,由此治疗该有需要的个体的该癌症。

[0270] 一方面,本发明提供抑制表达癌症相关抗原的肿瘤生长的方法,其包含使该肿瘤的癌细胞与包含偶联至结合至该癌症相关抗原的特异性剂的PUCR的免疫细胞接触,使得该免疫细胞因响应该抗原而活化并靶向该肿瘤的癌细胞,其中该肿瘤的生长受到抑制。在一些实施例中,免疫细胞是T细胞。在其他实施例中,免疫细胞是NK细胞。在一些实施例中,免疫细胞是NK-92细胞。在一些实施例中,免疫细胞杀死肿瘤细胞。

[0271] 一方面,本发明提供用于抑制表达癌症相关抗原的癌细胞群的增殖或减少该癌细胞群的方法,该方法包含使该表达癌症相关抗原的细胞群与包含偶联至结合至该癌症相关抗原的特异性剂的本发明PUCR的宿主细胞接触,由此抑制表现癌症相关抗原的癌细胞群的增殖或减少该癌细胞群。在某些方面中,该方法导致与个体中的恶性细胞及/或癌细胞在施用宿主细胞之前的数量、数目、量或百分比相比,个体中的恶性细胞及/或癌细胞的数量、数目、量或百分比减少至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少65%、至少75%、至少85%、至少95%或至少99%。在一个实施例中,个体是人类。

[0272] 另一方面,本发明提供治疗个体的由致病性生物体引起的医学病况的方法,该方法包含向该个体施用包含本发明PUCR的经分离的宿主细胞或该宿主细胞群。在一些实施例中,经分离的宿主细胞是免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)。在一些实施例中,包含本发明PUCR的经分离的宿主细胞源自该个体。在一些实施例中,包含本发明PUCR的经分离的宿主细胞并非源自该个体。在一些实施例中,经分离的宿主细胞是来自自己确立细胞系(例如,NK-92细胞)的细胞。

[0273] 一方面,本发明提供治疗有需要的个体的由致病性生物体引起的医学病况的方法,该方法包含:(a)测定该个体的致病性生物体抗原谱;(b)选择结合至(a)中所鉴别的该抗原的特异性剂;及(c)施用包含结合至(例如,偶联)至(b)中所鉴别的该特异性剂的PUCR的免疫细胞,由此治疗有需要的个体的由致病性生物体引起的医学病况。

[0274] 一方面,本发明提供使有需要的个体的由致病性生物体引起的感染消退的方法,该方法包含:(a)测定该个体的致病性生物体抗原谱;(b)选择结合至(a)中所鉴别的该抗原的特异性剂;及(c)施用包含结合至(例如,偶联)至(b)中所鉴别的该特异性剂的PUCR的免疫细胞,由此使有需要的个体的由致病性生物体引起的感染消退。

[0275] 一方面,本发明提供杀死有需要的个体的致病性生物体的方法,其包含使致病性生物体与包含偶联至结合至该致病性生物体的抗原的特异性剂的PUCR的免疫细胞接触,使得该免疫细胞因响应该抗原而活化并靶向该致病性生物体或经该致病性生物体感染的个体的细胞,其中该致病性生物体被杀死。在一些实施例中,免疫细胞是T细胞。在其他实施例中,免疫细胞是NK细胞。在一些实施例中,免疫细胞是NK-92细胞。在一些实施例中,免疫细胞杀死该致病性生物体或经该致病性生物体感染的个体的细胞。

[0276] 一方面,本发明提供抑制致病性生物体群的增殖或减少该致病性生物体群的方法,该方法包含使该个体中的该致病性生物体群与包含偶联至结合至该致病性生物体的抗原的特异性剂的本发明PUCR的宿主细胞接触,由此抑制致病性生物体群的增殖或减少该致病性生物体群。在某些方面中,该方法导致与个体中的致病性生物体在施用宿主细胞之前的数量、数目、量或百分比相比,个体中的致病性生物体的数量、数目、量或百分比减少至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少65%、至少75%、至少85%、至少95%或至少99%。在一个实施例中,个体是人类。

[0277] 在一些实施例中,致病性生物体选自:朊蛋白、病毒、原生动物、细菌、真菌或寄生虫。不希望受限于任何具体理论,本发明方法尤其有利于治疗由致病性生物体引起的医学病况,该致病性生物体能经历抗原性变异作为免疫逃避机制(例如,布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*);例如,参见Horn(2014)MOL.BIOCHEM.PARASITOL.195(2):123-129)。因此,例如,通过使用包含本文所揭示的PUCR的宿主细胞,疗法可经定制化以靶向致病性生物体表达的抗原性变体。在一些实施例中,致病性生物体是病原性病毒或病原性细菌。在一些实施例中,病毒选自:HIV、流行性感病毒、疱疹病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、肝炎病毒(例如,A、B、C、D、E及/或G型肝炎病毒)、巨细胞病毒、猿猴免疫缺失病毒、脑炎病毒、水痘带状疱疹病毒、艾司坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)及属冠状病毒科(Coronaviridae)、双核糖核酸病毒科(Birnaviridae)或丝状病毒科(Filoviridae)的病毒。在一些实施例中,细菌选自:分枝杆菌属(*Mycobacterium*) (例如,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*))、披衣菌属(*Chlamydia*)、奈瑟菌属(*Neisseria*) (例如,淋

病双球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*))、志贺杆菌属 (*Shigella*)、沙门杆菌属 (*Salmonella*)、莫拉菌属 (*Moraxella*) (例如,卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*))、弧菌属 (*Vibrio*) (例如,霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*))、密螺旋体属 (*Treponema*) (例如,梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum*))、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、博德氏菌属 (*Bordetella*) (例如,百日咳博德氏菌 (*Bordetella pertussis*))、布氏杆菌属 (*Brucella*)、弗朗西斯氏菌属 (*Francisella*) (例如,土伦病弗朗西斯氏菌 (*Francisella tularensis*))、螺杆菌属 (*Helicobacter*) (例如,幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*))、钩端螺旋体属 (*Leptospira*) (例如,问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*))、军团菌属 (*Legionella*) (例如,嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*))、耶尔辛氏菌属 (*Yersinia*) (例如,鼠疫耶尔辛氏菌 (*Yersinia pestis*))、链球菌属 (*Streptococcus*) (例如,肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*))及嗜血杆菌属 (*Haemophilus*) (例如,流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*))。在一些实施例中,寄生虫选自:住血吸虫属 (*Schistosoma*) (例如,曼森氏住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*))、锥虫属 (*Trypanosoma*) (例如,布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*))、片吸虫属 (*Fasciola*) (例如,肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*))、鞭虫属 (*Trichuris*) (例如,鞭形鞭虫 (*Trichuris trichiura*))、疟原虫属 (*Plasmodium*) (例如,间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)及恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*))。在一些实施例中,原生动物选自:阿米巴属 (*Entamoeba*) (例如,溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*))、隐孢子虫属 (*Cryptosporidium*) (例如,小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*))、弓虫属 (*Toxoplasma*) (例如,弓虫 (*Toxoplasma gondii*))及梨形鞭毛虫属 (*Giardia*) (例如,蓝氏梨形鞭毛虫 (*Giardia lamblia*))。

[0278] 在本发明的一些方面中,将包含PUCR的宿主细胞施用至个体,使得在将宿主细胞施用至个体后,宿主细胞(或其后代)在该个体中持续给定天数,包括但不限于至少0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天或更久。在本发明的一些方面中,将包含PUCR的宿主细胞施用至个体,且在将宿主细胞施用至个体后,宿主细胞(或其后代)在个体中持续至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年、5年或更久。

[0279] 在一些实施例中,向个体施用包含PUCR的宿主细胞,该PUCR已经特异性剂程序化(即,偶联)。由于一些或所有经程序化PUCR可在正常质膜再循环过程期间由该宿主细胞内化,宿主细胞可展现降低的结合至靶分子的能力或降低的对靶分子的特异性。不希望受限于任何理论,经程序化PUCR由宿主细胞内化可是尤其有利的,因为其提供调节包含经程序化PUCR的宿主细胞的活性(例如,细胞毒性活性)的方式。在一些实施例中,必须向个体再次施用包含已经特异性剂程序化的PUCR的宿主细胞。在一些实施例中,包含尚未经特异性剂程序化(即未经偶联)的PUCR的宿主细胞的来源是个体。在一些实施例中,包含尚未经特异性剂程序化(即,未经偶联)的PUCR的宿主细胞的来源并非个体。

[0280] 一方面,本发明提供药物组合物,其包含如本文所述的包含PUCR的宿主细胞与一种或多种医药或生理上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的组合。这样的组合物可包含缓冲液(例如,缓冲盐水(例如,磷酸盐缓冲盐水)及诸如此类);碳水化合物,例如葡萄糖、甘露

糖、蔗糖、聚葡萄糖、糖醇(例如,甘露醇);蛋白质(例如,生长因子及细胞因子);氨基酸;抗氧化剂;螯合剂(例如,EDTA或EGTA);佐剂(例如,氢氧化铝);及防腐剂。在一些实施例中,用于本发明中的药物组合物经调配用于静脉内施用。

[0281] 本发明组合物可通过本领域已知的任何方式来施用,包括例如气溶胶吸入、注射、摄取、输血(transfusion)、植入或移植。本文所述组合物(例如如本文所述包含PUCR的宿主细胞)可以以下方式施用至个体:经动脉、皮下、皮内、肿瘤内、结内、髓内、肌内、静脉内(i.v.)注射或腹膜内。在一个实施例中,本发明组合物是通过皮内或皮下注射施用至个体。在另一实施例中,本发明组合物是通过静脉内注射施用。在一个实施例中,本发明组合物是通过直接注射至肿瘤、淋巴结或感染位点中来施用。欲施用至个体的本发明组合物的准确量或剂量可由医师考虑以下的个体差异后确定:年龄、体重、肿瘤大小、转移、感染程度、个体的现有医学病况及个体的当前生理状况。

[0282] 在一个实施例中,包含本文所述宿主细胞的药物组合物可以约 10^1 至约 10^9 个细胞/kg体重的剂量施用。在上文所列举剂量中间的范围(例如约 10^2 至约 10^8 个细胞/kg体重、约 10^4 至约 10^7 个细胞/kg体重、约 10^5 至约 10^6 个细胞/kg体重)也意欲是本发明的一部分。在一些实施例中,本文所述宿主细胞可以约 10^2 至约 10^{11} 细胞/ m^2 的剂量施用。在上文所列举剂量中间的范围,(例如约 10^3 至约 10^9 细胞/ m^2 、约 10^4 至约 10^7 细胞/ m^2 、约 10^5 至约 10^6 细胞/ m^2)也意欲是本发明的一部分。此外,意欲包括使用上文所列举的值中的任一者的组合作为上限及/或下限的值的范围。在一些实施例中,将约 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或更多个本文所述宿主细胞施用至个体。宿主细胞组合物也可以这些剂量多次施用。

[0283] III. 范例

[0284] 通过以下实例进一步阐释本发明,这样的实例决不应被视为限制性。所引用的所有参考文献(包括参考文献、所颁布专利、及公开专利申请案)的内容,如在本申请案通篇所引用,皆是以引用方式明确并入本文中。另外应理解,所有随附图式及表格的内容也是以引用方式明确并入本文中。

[0285] 实例1. 人源化及鼠类38C2 scFv-Fc的构筑及表征

[0286] 鼠类单克隆抗体38C2是由Scripps Research Institute的Lerner/Barbas小组在1990年代发现的催化性抗体(Wagner等人SCIENCE (1995) 270:1797-1800)。可变域含有位于疏水核心中的赖氨酸残基。由于微化学环境,赖氨酸侧链 NH_2 基团在生理条件下保持未质子化,从而可攻击反应性部分以形成共价键(图2)。如图2中所示,38C2抗体(例如,人源化38C2抗体)的可变域中的Lys93残基可用作亲核剂以与特异性剂的反应性部分相互作用,从而导致在Lys93残基与特异性剂之间形成共价键。

[0287] 为生成人源化或鼠类38C2的人源化及鼠类38C2单链可变片段(scFv),将鼠类及人源化38C2IgG的重链及轻链可变域序列(Rader等人J.MOL.BIOL. (2003) 332:889-899)密码子优化,合成,且重新格式化为编码scFv的基因,并克隆至哺乳动物细胞表达载体中,使得scFv片段在框内融合至人类IgG1的Fc(恒定片段)部分以供表达及纯化。用任一表达载体使用转染试剂lipofectamine (ThermoFisher) 转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。鼠类及人源化38C2 scFv-Fc二者皆纯化至对于催化活性测试呈均质性。图3显示在非还原性及还原性条件下对人源化及鼠类38C2 scFv-Fc二者的SDS-PAGE分析。如图3中所示,人源化及鼠类38C2 scFv-Fc二者皆使用蛋白质A亲和层析纯化,且单一scFv-Fc的分子量在还原性条件下为约

60kDa,而在非还原性条件下,scFv-Fc的分子量为约120kDa,指示形成二聚体。

[0288] 为测定纯化鼠类及人源化38C2 scFv-Fc是否保持催化活性,且因此具有功能性,使含有反应性部分(即氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯)的代表性特异性剂与这样的分子偶联。简言之,将1.6 μ L于DMSO中的氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯(1.0mg/mL)与96 μ L于PBS,pH 7.4中的38C2 scFv-Fc(0.52mg/mL)在PCR管中混合。将PCR管使用管旋转器在室温下恒定旋转过夜。使用具有Ultracel-10膜的Amicon Ultra-4离心过滤装置(EMD Millipore目录号UFC801008),通过离心过滤自反应移除过量氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯。

[0289] 然后提交每一样品以供质谱分析。质谱数据指示,大部分38C2scFv-Fc偶联至1或2个拷贝的氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯,从而确认,纯化鼠类或人源化38C2 scFv-Fc在催化与氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯的偶联反应中发挥功能(参见图4及5)。实施肽图谱分析以确认氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯在人源化38C2 scFv-Fc上的偶联位点,如在例如Xie等人(2009) WATERS APPLICATION NOTE 720002897EN中所述(参见图6)。含有氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯的肽片段的质量显示含有赖氨酸残基,这进一步表明偶联发生在重链的Lys 93上(图6、表5)。

[0290] 表5.重链上偶联的肽片段的经计算及经测量的质量。

[0291]

	理论值	测量值	
	Mono	Mono	误差(ppm)
(M+H) ⁺	1122.51659	1122.578	54.3
(M+2H) ²⁺	561.76223	561.791	51.6

[0292] 实例2.可程序化的通用细胞受体的生成

[0293] 为生成可程序化的通用细胞受体(PUCR),使编码PUCR的域的基因密码子优化且定制合成(GenScript)。PUCR的全长基因编码以下的框内序列:1)用于分子的分泌或细胞表面表达的信号肽;2)用于PUCR表现检测的myc-标签;3)如实例1中所述的催化性抗体或其催化性部分(例如,scFv-Fc);4)铰链区(例如,CD8铰链区);5)跨膜域(例如,CD3 ζ 跨膜域);6)细胞质域(例如,用于T细胞持久性的CD28细胞内域及/或用于NK或T细胞活化的CD3 ζ 细胞内域)。各组分的氨基酸及核酸序列列示于下表5中。

[0294] 表6.PUCR组分序列

[0295]

SEQ ID NO:	说明	序列
1	信号肽氨基酸序列	MEWSWVFLFFLSVTTGVHS
2	Myc-标签氨基酸序列	EQKLISEEDL
3	鼠类38C2 scFv氨基酸序列 scFv呈VL-连接体-VH构形。加下划线的序列是多Gly ₄ Ser连接体。	DVVMTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSLHT YGSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV DRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYFCSQG THLPYTFGGGTKLEIK <u>GGGGSGGGSGGGGS</u> EVKLVESGGGLVQPGGTMKLSCEISGLTFRNY WMSWVRQSPEKGLEWVAEIRLRSDNYATHY AESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMNSLRTEDTG IYYCKTYFYFSYWGQGTLVTVSA
4	人源化38C2 scFv氨基酸序列 scFv呈VL-连接体-VH构形。加下划线的序列是多Gly ₄ Ser连接体。	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLHTY GSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFCSQGT HLPYTFGGGTKVEIK <u>GGGGSGGGSGGGGSEV</u> QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYW MSWVRQSPEKGLEWVSEIRLRSDNYATHYAE SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTGIY YCKTYFYFSYWGQGTLVTVSS
5	CD8铰链氨基酸序列 这是CD8铰链	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFA

[0296]

	序列的片段。 长度可延伸至CD8分子的N末端区域中。取决于构筑体，铰链中的唯一半胱氨酸(加下划线)可突变用于增加PUCR的表达。	
6	CD3ζ跨膜域氨基酸序列 加下划线者是CD3ζ跨膜域序列的经定义疏水延伸段。也包括跨膜域两侧侧接的带电荷残基以终止易位。	LDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVK
7	CD28细胞内域氨基酸序列	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA PPRDFAAYRS
8	CD3 ζ 细胞内域氨基酸序列	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
9	具有Myc-标签及信号肽的鼠类PUCR的氨基	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDVVMQTPLSLP VRLGDQASISCRSSQSLLHTYGYSPYLNWYLQK PGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFT

[0297]

	酸序列	LRISRVEAEDLG VYFCSQGTHLPYTFGGGTKL EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVKLVESGGGLVQ PGGTMKLSCEISGLTFRNYWMSWVRQSPEKG LEWVAEIRLRSDNYATHYAESVKGKFTISRDD SKSRLYLQMNSLRTEDTGIYYCKTYFYFSFY WGQGT LVTVSAEQKLISEEDLAKPTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFALDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKRS KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	具有Myc-标签 及信号肽的人 源化PUCR的氨 基酸序列	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSELQMTQSPSSLS ASVGDRV TITCRSSQSL LHTYGPSYLNWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQSPEK GLEWVSEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTGIYYCKTYFYFSFY YWGQGT LVTVSSEQKLISEEDLAKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFALDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKRS KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0298]

102	具有Myc-标签 且无信号肽的 鼠类PUCR (氨基酸序列)	DVVMQTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSLLHT YGSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYFCSQG THLPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGS EVKLVESGGGLVQPGGTMKLSCEISGLTFRNY WMSWVRQSPEKGLEWVAEIRLRSDNYATHY AESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMNSLRTEDTG IYYCKTYFYFSYWGQGTLLTVSAEQKLISEE DLAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFALDPKLCYLLDGILFIYGV ILTALFLRVKRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
103	具有Myc-标签 且无信号肽的 人源化PUCR (氨基酸序列)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHTY GSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFCSQGT LPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYW MSWVRQSPEKGLEWVSEIRLRSDNYATHYAE SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTGIY YCKTYFYFSYWGQGTLLTVSSEQKLISEEDL AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFALDPKLCYLLDGILFIYGVI LTALFLRVKRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAY

		SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
11	信号肽(核酸序列)	ATGGAGTGGTCCTGGGTGTTCTTCTTTC TGTCCGTGACCACCGGTGTCCAC
12	Myc-标签(核酸序列)	GAGCAGAACTCATTCTGAAGAGGACCTT
13	鼠类38C2 scFv (核酸序列)	GATGTAGTTATGACCCAGACGCCTCTTCTC TCCCCGTCCGGCTCGGAGACCAAGCCTCCA TCTCTTGCCGAAGTTCACAATCATTGTTGCA CACGTATGGATCCCCATATCTGAATTGGTAT CTCCAAAAGCCTGGACAGTCCCCCAAGCTG TTGATCTATAAAGTAAGTAATAGATTTTCCG GCGTTCCTGACCGCTTCAGTGGCTCAGGAA GCGGTACGGATTTTACTCTTCGGATTTCCCG CGTCGAAGCTGAAGATCTTGGTGTCTATTTT TGTTCTCAGGGAACGCACCTGCCATACACA TTCGGAGGGGGCACTAAGCTCGAAATCAAG GGCGGGGGCGGGTCAGGTGGTGGGGGCAG CGGCGGGGGTGGCAGCGAGGTTAAGCTTGT GGAAAGTGGAGGCGGGCTTGTGCAGCCGGG CGGGACCATGAACTGTCCTGCGAGATAAG TGGACTCACTTTTAGGAACTATTGGATGAG CTGGGTGCGACAGTCCCCCGAGAAGGGCCT TGAATGGGTTGCCGAAATACGGCTTCGATC AGACAACTATGCGACGCACTACGCTGAAAG CGTCAAAGGAAAATTCATATCAGCCGGGA CGACAGCAAGAGTAGACTTTATTTGCAGAT GAATAGTTTGAGGACGGAAGATACGGGAAT ATATTATTGCAAAACATACTTCTATTCATTT TCATACTGGGGTCAGGGCACGTTGGTTACG

[0299]

[0300]

		GTTTCAGCC
14	人源化38C2 scFv (核酸序列)	GAGCTTCAGATGACCCAAAGTCCCAGCTCT CTCTCCGCCTCTGTTCGGAGACAGGGTCACG ATAACCTGTCTGAAGTAGCCAGAGTCTTCTC CATACTTACGGAAGCCCATATCTTAACTGGT ATCTTCAGAAACCCGGTCAATCACCCAAGC TGCTGATATATAAAGTGTCTAACCGGTTTTTC TGGTGTGCCGAGTCGATTTTCAGGATCAGG GAGCGGCACGGATTTCACTCTTACGATCTCT AGTTTGCAACCTGAGGATTTTGCTGTATACT TTTGCAGCCAAGGTACTCATCTTCCTTATAC GTTCGGAGGGGGGTACCAAAGTAGAAATTAA AGGAGGAGGAGGGTCCGGAGGAGGGGGCA GCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTACAATC GTGGAATCTGGCGGGGGGCTGGTGCAACCT GGGGGTTCTCTCCGCCTGAGCTGTGCTGCAT CCGGCTTCACCTTTTCTAATTATTGGATGAG CTGGGTACGGCAGTCACCGGAGAAAGGTCT GGAGTGGGTGTCTGAGATACGACTTAGATC AGACAACTACGCGACGCATTACGCCGAGAG CGTGAAAGGAAGATTTACCATAAGCAGAGA CAATTCAAAAAACACCCTGTACCTCCAAAT GAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGGGAT ATATTACTGTAAAACCTACTTTTACAGTTTT AGTTATTGGGGCCAGGGAACGCTTGTAAC GTTAGCTCT
15	CD8铰链(核酸 序列)	GCTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGA CCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCG CAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGC

[0301]

		CGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACAC GAGGGGGCTGGACTTCGCC
16	CD3 ζ 跨膜域(核 酸序列)	CTCGATCCGAAGTTGTGCTACCTGTTGGACG GCATTCTCTTTATATACGGTGTCACTCCTGAC AGCGTTGTTTCTCCGAGTGAAG
17	CD28细胞内域 (核酸序列)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCC GGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGC TCC
18	CD3 ζ 细胞内域 (核酸序列)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC CCCCTCGCTAA
19	具有Myc-标签 且无信号肽的 鼠类PUCR (核 酸序列)	GATGTAGTTATGACCCAGACGCCTCTTTCTC TCCCCGTCCGGCTCGGAGACCAAGCCTCCA TCTCTTGCCGAAGTTCACAATCATTGTTGCA CACGTATGGATCCCCATATCTGAATTGGTAT CTCCAAAAGCCTGGACAGTCCCCCAAGCTG TTGATCTATAAAGTAAGTAATAGATTTTCCG

[0302]

GCGTTCCTGACCGCTTCAGTGGCTCAGGAA
GCGGTACGGATTTTACTCTTCGGATTTCCCG
CGTCGAAGCTGAAGATCTTGGTGTCTATTTC
TGTTCTCAGGGAACGCACCTGCCATACACA
TTCGGAGGGGGCACTAAGCTCGAAATCAAG
GGCGGGGGCGGGTCAGGTGGTGGGGGCAG
CGGCGGGGGTGGCAGCGAGGTTAAGCTTGT
GGAAAGTGGAGGCGGGCTTGTGCAGCCGGG
CGGGACCATGAAACTGTCCTGCGAGATAAG
TGGACTCACTTTTAGGAACTATTGGATGAG
CTGGGTGCGACAGTCCCCGAGAAGGGCCT
TGAATGGGTGCCGAAATACGGCTTCGATC
AGACAACTATGCGACGCACTACGCTGAAAG
CGTCAAAGGAAAATTCATCATCAGCCGGGA
CGACAGCAAGAGTAGACTTTATTTCAGAT
GAATAGTTTGAGGACGGAAGATACGGGAAT
ATATTATTGCAAAACATACTTCTATTCAATT
TCATACTGGGGTCAGGGCACGTTGGTTACG
GTTTCAGCCGAGCAGAAGCTCATTTCCGAA
GAAGATCTCGCAAAGCCGACAACGACGCCG
GCACCCCGGCCTCCCACCCCGCCCCCACT
ATAGCTAGTCAACCTCTTTCACTGCGCCCTG
AAGCGTGTAGACCTGCAGCCGGGGGAGCAG
TCCATACGCGCGGACTTGATTCGCCCTCGA
CCCCAAGTTGTGTTACCTTTTGGACGGGATC
CTCTTCATTTACGGTGTCAATTCTTACTGCCTT
GTTTCTCAGGGTAAAAAGGTCTAAGAGATC
CCGACTCCTCCATTCTGACTACATGAATATG
ACACCGAGGAGACCGGGACCAACTCGGAA
GCATTATCAGCCATACGCGCCCCCCCCGCGA
TTTCGCGGCATACAGGTCAAGAGTCAAGTT

[0303]

		CTCCCGCAGCGCAGACGCGCCCGCTTATCA GCAAGGTCAAAATCAACTCTACAATGAGCT CAATCTGGGACGACGGGAGGAGTACGATGT CCTCGACAAGAGGAGAGGTCGGGATCCTGA AATGGGTGGCAAACCCAGCGACGCAAGA ATCCTCAGGAGGGTCTCTACAACGAGCTGC AAAAAGATAAAATGGCGGAGGCGTATAGT GAAATAGGGATGAAAGGGGAAAGACGCCG GGGAAAAGGACATGATGGTCTGTATCAGGG TCTGTCAACAGCTACTAAAGACACATACGA TGCGCTGCACATGCAAGCGTTGCCGCCGAG G
20	具有Myc-标签 且无信号肽的 人源化PUCR (核酸序列)	GAGCTTCAGATGACCCAAAGTCCCAGCTCT CTCTCCGCCTCTGTTCGGAGACAGGGTCACG ATAACCTGTCTGAAGTAGCCAGAGTCTTCTC CATACTTACGGAAGCCCATATCTTAAGTGGT ATCTTCAGAAACCCGGTCAATCACCCAAGC TGCTGATATATAAAGTGTCTAACCGGTTTTT TGGTGTGCCGAGTCGATTTTCAGGATCAGG GAGCGGCACGGATTTCACTCTTACGATCTCT AGTTTGCAACCTGAGGATTTTGCTGTATACT TTTGCAGCCAAGGTACTCATCTTCCTTATAC GTTCGGAGGGGGTACCAAAGTAGAAATTAA AGGAGGAGGAGGGTCCGGAGGAGGGGGCA GCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTACAATC GTGGAATCTGGCGGGGGGCTGGTGCAACCT GGGGGTCTCTCCGCCTGAGCTGTGCTGCAT CCGGCTTCACCTTTTCTAATTATTGGATGAG CTGGGTACGGCAGTCACCGGAGAAAGGTCT GGAGTGGGTGTCTGAGATACGACTTAGATC

[0304]

AGACAACTACGCGACGCATTACGCCGAGAG
 CGTGAAAGGAAGATTTACCATAAGCAGAGA
 CAATTCAAAAAACACCCTGTACCTCCAAAT
 GAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGGGAT
 ATATTACTGTAAAACCTACTTTTACAGTTTT
 AGTTATTGGGGCCAGGGAACGCTTGTAAC
 GTTAGCTCTGAGCAGAAGCTCATTTCGAA
 GAAGATCTCGCAAAGCCGACAACGACGCCG
 GCACCCCGGCCTCCCACCCCGCCCCCCT
 ATAGCTAGTCAACCTCTTTCCTGCGCCCTG
 AAGCGTGTAGACCTGCAGCCGGGGGAGCAG
 TCCATACGCGCGGACTTGATTCGCCCTCGA
 CCCCAGTTGTGTTACCTTTTGGACGGGATC
 CTCTTCATTTACGGTGTCTTCTTACTGCCTT
 GTTTCTCAGGGTAAAAAGGTCTAAGAGATC
 CCGACTCCTCCATTCTGACTACATGAATATG
 ACACCGAGGAGACCGGGACCAACTCGGAA
 GCATTATCAGCCATACGCGCCCCCCCCGCGA
 TTTCGCGGCATACAGGTCAAGAGTCAAGTT
 CTCCCGCAGCGCAGACGCGCCCGCTTATCA
 GCAAGGTCAAAATCAACTCTACAATGAGCT
 CAATCTGGGACGACGGGAGGAGTACGATGT
 CCTCGACAAGAGGAGAGGTCGGGATCCTGA
 AATGGGTGGCAAACCCCAGCGACGCAAGA
 ATCCTCAGGAGGGTCTCTACAACGAGCTGC
 AAAAAGATAAAATGGCGGAGGCGTATAGT
 GAAATAGGGATGAAAGGGGAAAGACGCCG
 GGGAAAAGGACATGATGGTCTGTATCAGGG
 TCTGTCAACAGCTACTAAAGACACATACGA
 TGCGCTGCACATGCAAGCGTTGCCGCCGAG
 G

[0305] 任一前述示例性序列可包括于本文所述PUCR中。

[0306] 实例3. 用特异性剂标记表现可程序化的通用细胞受体的T细胞或NK细胞 (PUCR-T或PUCR-NK细胞)

[0307] 生成PUCR-T细胞及PUCR-NK细胞。为标记表达PUCR的PUCR-T细胞或PUCR-NK细胞，

使细胞与含有靶向部分(例如,肿瘤特异性蛋白质结合部分)及反应性部分的特异性剂(例如,抗原结合分子)接触。反应性部分及靶向部分可经由连接体(例如,聚乙二醇(PEG)片段)连接。举例而言,使用叶酸-二酮、叶酸-氮杂环丁酮、DUPA-二酮及DUPA-氮杂环丁酮作为特异性剂。该4种示例性特异性剂的化学结构说明于图7-11中。叶酸用作靶向叶酸盐受体的靶向部分,该受体在多种肿瘤类型的表面上高度过表达,且2-[3-(1,3-二羧基丙基)-脲基]戊二酸(DUPA)用作靶向前列腺特异性膜抗原(PSMA)的靶向部分。二酮或氮杂环丁酮基团是反应性部分,其与PUCR内的催化性抗体(例如38C2抗体或其催化性部分)中的反应性Lys残基相互作用。

[0308] 举例而言,将PUCR-T细胞(1×10^5)及PUCR-NK细胞(1×10^5)与50nM叶酸-二酮一起在PBS中在4℃下培育2小时。在将细胞洗涤3次后,使细胞经受结合及细胞毒性分析,如下文实例中所述。

[0309] 实例4. 包含经特异性剂程序化的PUCR及所靶向抗原的T细胞的结合特异性

[0310] 为测定经特异性剂(例如,叶酸-二酮)程序化(即,经偶联)的PUCR的结合特异性,实施竞争性结合分析。具体而言,将PUCR-T细胞或表达叶酸受体的KB细胞(1×10^5 个细胞)分别与50nM叶酸-二酮及变化浓度的游离二酮或游离叶酸一起培育。在4℃下2小时培育阶段后,用FACS缓冲液将细胞洗涤3次。对于KB细胞,将细胞与藻红素(PE)标记的抗二酮抗体一起在4℃下培育30分钟,且用FACS缓冲液再洗涤2次。立即使用Intellicyt HTFC分析细胞,且通过PE发射测定叶酸-二酮的结合。对于PUCR-T细胞,将细胞与藻红素(PE)标记的抗叶酸抗体在4℃下一起培育30分钟,且用FACS缓冲液再洗涤2次。立即使用Intellicyt HTFC分析细胞,且通过PE发射测定叶酸-二酮的结合。

[0311] 实例5. PUCR-T细胞的细胞毒性

[0312] 为测定已经叶酸-二酮特异性剂程序化的PUCR-T细胞是否可有效靶向表达叶酸盐受体的细胞,实施细胞毒性分析。具体而言,将经叶酸-二酮程序化(即,偶联)的PUCR-T细胞以10:1效应细胞(PUCR T细胞):靶细胞(KB细胞)E:T比率与表达叶酸盐受体的KB细胞在100 μ l含有10%胎牛血清(FBS)的缺叶酸RPMI培养基中混合,且与变化浓度的叶酸-二酮在37℃下一起培育24小时。通过使用CytoTox96[®]非放射性细胞毒性分析(Promega目录号G1780)量化释放至培养基中的乳酸脱氢酶的量来计算细胞毒性活性。

[0313] 实例6. 表达经包含可检测部分的特异性剂程序化的PUCR的NKL自然杀伤细胞的生成及表征

[0314] 为生成编码包含人源化38C2 scFab的PUCR的构筑体,通过将编码人源化38C2 VH域的核酸、编码人类 κ LC域的核酸、编码多GlySer连接体的核酸、编码人源化38C2 VH域的核酸及编码人类 γ 1HC恒定域1的核酸融合来设计编码人源化38C2 scFab的核酸。将所得核酸片段克隆至逆转录病毒载体中以编码包含以下的PUCR:N末端前导肽、之后的38C2 scFab、之后的杂合CD8及CD28铰链、CD28跨膜域、CD28细胞内域及CD3 ζ 细胞内域。PUCR的核酸及氨基酸序列显示于下文中。用编码PUCR的病毒载体转导NKL细胞。

[0315] 表7. PUCR组分序列

[0317]

	38C2 scFab	KLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYWMSWVRQSPKGLEWVSEIRLRSDNY ATHYAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TGIYYCKTYFYSFSYWGQGT LTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
104	无信号肽的全 长人源化38C2 scFab	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLHTYGS PYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSG SSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFG GGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECG GSGGGGSGGGGSGGGGSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQSPKGL EWVSEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTGIYYCKTYFYSFSYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHT
55	杂合CD8及	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG

[0318]

	CD28铰链氨基酸序列	AVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV KGKHLCPSP LFPGPSKP
56	杂合CD8及CD28铰链氨基酸序列的CD8部分	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFA
57	铰链连接体氨基酸序列	PR
58	杂合CD8及CD28铰链氨基酸序列的CD28部分	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFP GPSKP
24	CD28跨膜域氨基酸序列	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV
7	CD28细胞内域氨基酸序列	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAYRS
59	CD3ζ细胞内域氨基酸序列	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR
45	包含38C2 scFab氨基酸序列且有信号肽的全长PUCR	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSELQMTQSPSSLSASV GDRVTTICRSSQSLLHTYGSPYLNWYLQKPGQSP KLLIYKVS NRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG GGSGGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGGSG

[0319]

		GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYWMSWVRQSPEKGLEWVSEIRLRSDNY ATHYAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TGIYYCKTYFYFSYWGQGT LVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTAK PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSL LVT VAFIIFWVR SKRSRL LHS DYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
105	包含38C2 scFab氨基酸序 列且无信号肽 的全长PUCR	ELQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSL LHTYGS PYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPSRFSG SGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYFCSQGT HLPYTFG GGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGSGGGGSGG GSGGGGSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQSPEKGL EWVSEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRDN SKN TLYLQMN SLRAEDTGIYYCKTYFYFSYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYL

[0320]

		DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
46	信号肽核酸序 列	ATGGAATGGAGTTGGGTGTTTCCTTTTCTTTCTG AGTGTCACCACCGGAGTGCAC
47	人源化38C2 scFab核酸序列	AGCGAACTGCAGATGACCCAGTCCCCATCCAG TCTGAGCGCTAGCGTTGGTGACAGAGTTACTAT CACCTGCCGCTCTTCACAGAGCCTGTTGCACAC TTACGGCTCTCCTTACCTGAACTGGTATCTTCA GAAGCCTGGCCAAAGCCCTAAGCTGCTCATCT ACAAGGTGTCTAACAGGTTCTCCGGGGTTCCGT CCCGCTTTTCAGGGAGCGGGTCAGGAACAGAC TTCACCTTGACAATCTCAAGCCTCCAGCCCGAG GATTTTGCCGTCTATTTCTGCTCACAAGGCACA CATCTGCCGTATACCTTTGGGGGCGGGACAAA AGTCGAGATCAAAAGGACCGTCGCTGCACCAT CCGTGTTTATCTTCCCACCAAGTGACGAACAGC TCAAGAGCGGTACTGCCTCCGTTGTTTGTCTGC TGAACAACCTTCTATCCAAGGGAAGCAAAGGTG CAATGGAAAGTAGACAACGCTCTGCAGTCAGG CAACTCCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGATA GCAAAGATTCAACATACAGCCTGAGCAGCACC CTCACCTGAGTAAGGCCGATTACGAGAAGCA CAAGGTTTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTTTCATCCCCAGTCACCAAATCTTTTAACC GCGGCGAATGCGGGGGAGGCTCTGGTGGAGGC

[0321]

		GGTTCTGGAGGGGGCTCAGGAGGAGGCGGTAG CGGCGGTGGTAGTGGGGGTGGCGGATCTGGCG GAGGTGGCTCAGGAGGAGGTAGCGGCGGCGGG GGCAGCGAGGTCCAGCTGGTAGAGTCAGGTGG AGGATTGGTGCAGCCCGGCGGCAGTCTTAGAC TCAGCTGTGCGGCCAGCGGATTTACTTTCTCAA ATTATTGGATGTCTTGGGTCAGGCAGAGCCCAG AGAAAGGCCTGGAATGGGTGTCAGAGATCCGA CTGAGAAGCGATAATTACGCGACTCATTATGC GGAAAGCGTTAAAGGTCGGTTCACTATTTACG AGATAATTCTAAGAATACCCTTTATCTGCAGAT GAACAGCTTGCGCGCCGAGGACACAGGCATCT ACTACTGTAAAACTTACTTCTATTCTTTTTCTA CTGGGGACAGGGGACTCTCGTTACAGTCAGTA GCGCCTCCACCAAGGGTCCTAGTGTCTTTCCCC TGGCCCCCTCATCCAAGTCCACGTCAGGAGGC ACCGCGGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAAGACTAC TTTCCTGAGCCAGTCACCGTGTCTGGAATTCC GGCGCGCTTACTTCTGGCGTGCACACTTTCCCC GCCGTCTCCAGAGCAGTGGGCTGTATTCCCTG TCTTCCGTAGTCACTGTGCCAAGCTCCAGTCTG GGAACCCAGACCTATATTTGTAATGTGAATCAT AAGCCGAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAACCGAAGTCATGTGACAAAACCCACACT
60	杂合CD8及 CD28铰链核酸 序列	GCTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACC ACCAACACCGGCGCCCAACCATCGCGTCGCAGC CCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCA GCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCT GGACTTCGCCCCTAGGAAAATTGAAGTTATGTA TCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAA

[0322]

		TGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACC TTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTA AGCCC
61	CD28跨膜域核 酸序列	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTG GCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT ATTATTTTCTGGGTG
17	CD28细胞内域 核酸序列	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGA CTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCC CACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
62	CD3 ζ 细胞内域 核酸序列	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC CGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTAC GATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCC TGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG GCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGC CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTAA
48	包含38C2 scFab核酸序列 及信号肽的全 长PUCR	ATGGAATGGAGTTGGGTGTTTCCTTTTCTTTCTG AGTGTCACCACCGGAGTGACAGCGAACTGCA GATGACCCAGTCCCCATCCAGTCTGAGCGCTAG CGTTGGTGACAGAGTTACTATCACCTGCCGCTC TTCACAGAGCCTGTTGCACACTTACGGCTCTCC TTACCTGAACTGGTATCTTCAGAAGCCTGGCCA AAGCCCTAAGCTGCTCATCTACAAGGTGTCTAA CAGGTTCTCCGGGGTTCCGTCCCGCTTTTCAGG GAGCGGGTCAGGAACAGACTTCACCTTGACAA TCTCAAGCCTCCAGCCCGAGGATTTTGCCGTCT

[0323]

ATTTCTGCTCACAAGGCACACATCTGCCGTATA
CCTTTGGGGGCGGGACAAAAGTCGAGATCAAA
AGGACCGTCGCTGCACCATCCGTGTTTATCTTC
CCACCAAGTGACGAACAGCTCAAGAGCGGTAC
TGCCTCCGTTGTTTGTCTGCTGAACAACCTTCTAT
CCAAGGGAAGCAAAGGTGCAATGGAAAGTAG
ACAACGCTCTGCAGTCAGGCAACTCCCAGGAG
TCAGTGACCGAGCAGGATAGCAAAGATTCAAC
ATACAGCCTGAGCAGCACCTCACCCTGAGTA
AGGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTTTACGCC
TGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTTTCATCCCCA
GTCACCAAATCTTTTAACCGCGGCGAATGCGG
GGGAGGCTCTGGTGGAGGCGGTTCTGGAGGGG
GCTCAGGAGGAGGCGGTAGCGGCGGTGGTAGT
GGGGGTGGCGGATCTGGCGGAGGTGGCTCAGG
AGGAGGTAGCGGCGGCGGGGGCAGCGAGGTCC
AGCTGGTAGAGTCAGGTGGAGGATTGGTGCA
CCCGGCGGCAGTCTTAGACTCAGCTGTGCGGCC
AGCGGATTTACTTTCTCAAATTATTGGATGTCT
TGGGTCAGGCAGAGCCCAGAGAAAGGCCTGGA
ATGGGTGTCAGAGATCCGACTGAGAAGCGATA
ATTACGCGACTCATTATGCGGAAAGCGTTAAA
GGTCGGTTCACTATTTACGAGATAATTCTAAG
AATACCCTTTATCTGCAGATGAACAGCTTGCGC
GCCGAGGACACAGGCATCTACTACTGTAAAC
TACTTCTATTCTTTTTCCTACTGGGGACAGGG
GACTCTCGTTACAGTCAGTAGCGCCTCCACCAA
GGGTCCTAGTGTCTTTCCCTGGCCCCCTCATC
CAAGTCCACGTCAGGAGGCACCGCGGCTCTGG
GCTGTCTGGTCAAAGACTACTTTCCTGAGCCAG
TCACCGTGTCTGGAATTCCGGCGCGCTTACTT

[0324]

CTGGCGTGCACACTTTCCCCGCCGTCCTCCAGA
GCAGTGGGCTGTATTCCCTGTCTTCCGTAGTCA
CTGTGCCAAGCTCCAGTCTGGGAACCCAGACCT
ATATTTGTAATGTGAATCATAAGCCGAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCGAAGTC
ATGTGACAAAACCCACACTGCTAAGCCCACCA
CGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCG
CCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGC
AGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCTA
GGAAAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACC
TAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATC
CATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCC
CCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGT
GCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTA
TAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT
CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGC
ACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGC
CCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT
GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC
CGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTAC
GATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCC
TGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG
GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG
GCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGC
CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC
AGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0325]

106	包含38C2 scFab且无信号 肽核酸序列的 全长PUCR	AGCGAACTGCAGATGACCCAGTCCCCATCCAG TCTGAGCGCTAGCGTTGGTGACAGAGTTACTAT CACCTGCCGCTCTTCACAGAGCCTGTTGCACAC TTACGGCTCTCCTTACCTGAACTGGTATCTTCA GAAGCCTGGCCAAAGCCCTAAGCTGCTCATCT ACAAGGTGTCTAACAGGTTCTCCGGGGTTCGCT CCCGCTTTTCAGGGAGCGGGTCAGGAACAGAC TTCACCTTGACAATCTCAAGCCTCCAGCCCGAG GATTTTGCCGTCTATTTCTGCTCACAAGGCACA CATCTGCCGTATACCTTTGGGGGCGGGACAAA AGTCGAGATCAAAAGGACCGTCGCTGCACCAT CCGTGTTTATCTTCCCACCAAGTGACGAACAGC TCAAGAGCGGTACTGCCTCCGTTGTTTGTCTGC TGAACAACCTTCTATCCAAGGGAAGCAAAGGTG CAATGGAAAGTAGACAACGCTCTGCAGTCAGG CAACTCCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGATA GCAAAGATTCAACATACAGCCTGAGCAGCACC CTCACCTGAGTAAGGCCGATTACGAGAAGCA CAAGGTTTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTTTCATCCCCAGTCACCAAATCTTTTAACC GCGGCGAATGCGGGGGAGGCTCTGGTGGAGGC GGTCTGGAGGGGGCTCAGGAGGAGGCGGTAG CGGCGGTGGTAGTGGGGGTGGCGGATCTGGCG GAGGTGGCTCAGGAGGAGGTAGCGGCGGCGGG GGCAGCGAGGTCCAGCTGGTAGAGTCAGGTGG AGGATTGGTGCAGCCCGGCGGCAGTCTTAGAC TCAGCTGTGCGGCCAGCGGATTTACTTTCTCAA ATTATTGGATGTCTTGGGTCAGGCAGAGCCCAG AGAAAGGCCTGGAATGGGTGTCAGAGATCCGA CTGAGAAGCGATAATTACGCGACTCATTATGC GGAAAGCGTTAAAGGTCGGTTCAGTATTTACG
-----	---	--

[0326]

AGATAATTCTAAGAATACCCTTTATCTGCAGAT
GAACAGCTTGCGCGCCGAGGACACAGGCATCT
ACTACTGTAAAACTTACTTCTATTCTTTTTCTA
CTGGGGACAGGGGACTCTCGTTACAGTCAGTA
GCGCCTCCACCAAGGGTCCTAGTGTCTTTCCCC
TGGCCCCCTCATCCAAGTCCACGTCAGGAGGC
ACCGCGGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAAGACTAC
TTTCCTGAGCCAGTCACCGTGTCTGGAATTCC
GGCGCGCTTACTTCTGGCGTGCACACTTTCCCC
GCCGTCCTCCAGAGCAGTGGGCTGTATTCCCTG
TCTTCCGTAGTCACTGTGCCAAGCTCCAGTCTG
GGAACCCAGACCTATATTTGTAATGTGAATCAT
AAGCCGAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT
GGAACCGAAGTCATGTGACAAAACCCACACTG
CTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA
CCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCC
CCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAG
CGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTG
GACTTCGCCCCTAGGAAAATTGAAGTTATGTAT
CCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAAT
GGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCT
TTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAA
GCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT
CCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC
CTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAG
CAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGA
CTCCCCGCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATT
ACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAG
CCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAA

[0327]

GAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGT
GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG
AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG
GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTC
TCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCC
CTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0328] 用特异性剂AZD-PEG8-生物素偶联(即,程序化)在NKL细胞膜上表达的包含38C2 scFab的PUCR(参见图11)。使用不表达PUCR的野生型NKL作为对照。AZD-PEG8-生物素包含反应性部分氮杂环丁酮,其与PUCR内的38C2 scFab的反应性赖氨酸反应且与其形成稳定共价键。简言的,将 1×10^5 个细胞用FluoroBrite™ DMEM洗涤两次且与 $1 \mu\text{M}$ 或 $10 \mu\text{M}$ DK-PEG8-生物素在 4°C 下一起培育1小时。在培育后,将细胞用FluoroBrite™ DMEM洗涤3次。经30min培育阶段期间在室温下在黑暗中将于含有1%BSA的FluoroBrite™ DMEM中的DTAF偶联的二级链霉亲和素添加至细胞。然后,在FACS分析之前将细胞洗涤3次。使用ACEA Biosciences NovoCyte流式细胞计数器测量荧光。用FlowJo软件分析数据,且依据增加的平均荧光强度量化DTAF偶联的链霉亲和素结合。使用GraphPad Prism软件绘制数据的图。

[0329] 如图12及13中所示,在NKL细胞中表达的PUCR使用 $1 \mu\text{M}$ 或 $10 \mu\text{M}$ AZD-PEG8-生物素顺利程序化。尽管在AZD-PEG8-生物素的浓度增加时观察到非特异性背景染色的增加,但观察到所表达PUCR的特异性偶联(即,程序化)且易于通过比较在不表达PUCR的NKL细胞与表达PUCR的NKL细胞中的标记程度来确定(参见图12)。

[0330] 实例7. 包含二酮反应性部分及偶联官能团的连接体与抗PSMA Fab片段的偶联

[0331] 为证明Fab片段可经由偶联官能团与包含反应性部分的连接体偶联(这将允许使用连接体偶联的Fab程序化PUCR),将包含如SEQ ID NO:50中所述的轻链可变域氨基酸序列及如SEQ ID NO:49中所述的重链可变域氨基酸序列的重组体抗PSMA克隆A11Fab片段偶联至二酮-PEG5-PFP酯连接体(参见图17)。二酮-PEG5-PFP(DK-PEG5-PFP)酯连接体包含反应性部分二酮。简言的,使重组体抗PSMA克隆A11Fab片段(5mg/mL)与1.2、2.5、5或10eq的DK-PEG5-PFP酯连接体反应。偶联反应是在 4°C 下在DPBS缓冲液中实施且混合约16-18h。通过离心过滤移除游离连接体。

[0332] 为检测DK-PEG5-PFP酯连接体与抗PSMA克隆A11Fab片段的偶联,实施疏水相互作用层析(HIC)HPLC。简言的,在 40°C 下在Agilent 1260Infinity系统上使用TOSOH TSKgel丁基-NPR($4.6 \text{mm ID} \times 10 \text{cm}$, $2.5 \mu\text{m}$)管柱通过HIC HPLC分析。使用 $25 \mu\text{g}$ 样品使用0-60%B的线性梯度经30min实施分析性运行:A=50mM磷酸钠及1M硫酸铵(pH 7),B=50mM磷酸钠及10%异丙醇(pH 7)。使用OpenLAB软件分析所有数据。

[0333] 图18A显示未偶联重组体抗PSMA克隆A11 Fab片段的质谱。与之相比,图18B显示重组体抗PSMA克隆A11 Fab片段与DK-PEG5-PFP连接体反应的偶联反应的质谱。在约48580的质量处观察到对应于单一连接体偶联事件的相当同质的峰。也在约49050的质量处观察到对应于每个Fab片段的两个连接体部分偶联的次要峰。这样的结果证明,Fab片段可经由偶

联官能团顺利偶联至包含反应性部分的连接体,这将允许PUCR的程序化。

[0334] 实例8.用偶联至包含反应性部分氮杂环丁酮的连接体的VEGFR2特异性Fab片段使重组体38C2 scFv-Fc活体外程序化

[0335] 为测定包含源自催化性抗体的scFv-Fc的分子是否保留催化活性且可顺利偶联至偶联至包含反应性部分的连接体的特异性剂,实施以下实验。

[0336] 包含反应性部分及偶联官能团的连接体偶联至抗VEGFR2 VK-B8 Fab片段。将包含如SEQ ID NO:52中所述轻链可变域氨基酸序列及SEQ ID NO:53中所述重链可变域氨基酸序列的重组体抗VEGFR2 VK-B8 Fab片段偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体(参见图19)。AZD-PEG13-PFP酯包含反应性部分氮杂环丁酮(AZD)。使用2.5eq连接体使AZD-PEG13-PFP酯与抗VEGFR2 VK-B8 Fab片段(5mg/mL)反应。在4℃下在DPBS缓冲液中进行偶联反应且混合约16-18小时。通过离心过滤移除游离连接体。

[0337] 对用偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的抗VEGFR2 VKB8 Fab片段使重组体38C2 scFv-Fc程序化的分析。为了检测,对偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的抗VEGFR2 VKB8 Fab片段进行荧光标记(“VKB8 Fab AZD 488”)。作为对照,使用经荧光标记(“VKB8 Fab 488”)或未经荧光标记(“VKB8 Fab”)的未偶联至AZD-PEG13-PFP酯连接体的抗VEGFR2 VKB8 Fab片段二者。将Fab片段缓冲液交换至100mM碳酸氢钠缓冲液(pH 8)中,并在黑暗室温下与10eq AlexaFluor®488NHS酯反应2小时。然后将荧光标记的Fab片段缓冲液交换至DPBS。为用经标记Fab片段使重组体38C2 scFv-Fc程序化,将鼠类38C2 scFv-Fc(“m38C2”)在1mg/mL下与亚饱和1.5eq Fab片段(即,0.75eq Fab/反应性38C2赖氨酸)在室温下一同培育16-18小时以防止SDS-PAGE凝胶在进一步分析期间超载。

[0338] 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。使用NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris蛋白质凝胶及NuPAGE MOPS SDS运行缓冲液在XCell SureLock微型电泳系统中实施SDS-PAGE分析。所有样品(2.5μg)包括NuPAGE LDS样品缓冲液。将样品加热至95℃并保持5min,之后加样。使用PageRuler Prestained NIR蛋白梯(10μL)分析荧光凝胶,之后进行SYPRO RUBY染色。将凝胶固定5min并遵循制造商说明书用Sypro® Ruby蛋白质凝胶染色剂染色。用Bio-Rad ChemiDoc MP系统进行成像并通过Image Lab软件分析。

[0339] 如图14中所示,使重组体鼠类38C2 scFv-Fc顺利偶联(即,程序化)至AZD标记的VK-B8 Fab片段,如通过检测VK-B8 Fab片段偶联的38C2 scFv-Fc的荧光高分子量复合物所证明的。不希望受限于任何具体理论,鉴于scFv缺少由存于全长抗体及Fab片段中的恒定区提供的结构刚性及稳定性,鼠类催化性38C2 scFv-Fc保持催化活性尤其令人惊讶。这样的结果进一步由氮杂环丁酮-PEG5-甲基酯顺利偶联至人源化重组体38C2 scFv-Fc支持,如实例1及图6中所证明。这样的结果证明,源自催化性抗体的scFv保留催化活性,且可顺利并入PUCR中以供经特异性剂程序化。

[0340] 实例9.表达经靶向PSMA的特异性剂程序化的PUCR的KHYG-1自然杀伤细胞的生成及表征

[0341] 为测定在KHYG-1 NK细胞表面上表达的PUCR是否可经程序化以特异性结合至所关注抗原,实施以下实验。用编码包含38C2 scFab的PUCR的构筑体转导KHYG-1细胞(阐述于实例6)中。此实验达成约30%的转导效率。

[0342] 使在KHYG-1 NK细胞的表面膜上表达的PUCR偶联(即,程序化)至特异性剂DK-PEG5-DUPA(参见图9)。DUPA是对前列腺特异性膜抗原(PSMA)具有特异性的靶向部分。反应性部分二酮与38C2 scFab的反应性赖氨酸反应,形成可逆共价键。在含有10%热不活化胎牛血清(FBS)及100IU/mL IL-2的RPMI-1640培养基中,将经构筑体转导以表达包含38C2 scFab的PUCR的野生型KHYG-1 NK细胞及NK细胞调节至 0.3×10^6 个细胞/mL(总计 20×10^6 个细胞)。在过夜培育后,使细胞沉淀并以 3×10^6 个细胞/mL再悬浮于含有10%热不活化FBS的RPMI-1640培养基中。为使经转导KHYG-1 NK细胞表达的PUCR程序化,通过在96孔深孔板中用含有10%热不活化FBS的RPMI实施 $1/2 \log$ 连续稀释制备0.1nM、1nM、10nM及100nM的特异性剂DK-PEG5-DUPA。在96孔v形底板中使用50 μ L特异性剂/孔一式三份测试各浓度的DK-PEG5-DUPA。在37℃下在加湿5%CO₂气氛中培育1.5-2小时后,使KHYG-1 NK细胞沉淀并用含有10%热不活化FBS的RPMI洗涤以移除游离特异性剂。

[0343] 通过检测重组体PSMA与包含经程序化PUCR的KHYG-1 NK细胞的结合来评价PUCR的程序化。简言的,使用FACS缓冲液(PBS、0.5%BSA、10%FBS、0.05%叠氮化钠)洗涤经处理NK细胞。用DyLight[®] 488 (Abcam目录号ab201799)对重组体人类PSMA(R&D Systems 4234-ZN号)进行荧光标记。将荧光标记的PSMA蛋白质添加至野生型KHYG-1NK细胞或表达经DK-PEG5-DUPA特异性剂程序化的PUCR的KHYG-1 NK细胞,且将其在4℃下培育30-60min。然后用FACS缓冲液洗涤细胞。使用ACEA Biosciences NovoCyte流式细胞计数器测量荧光。用FlowJo软件分析数据,且依据增加的平均荧光强度量化结合至效应细胞的PSMA。使用GraphPad Prism软件绘制数据的图。

[0344] 如图15中所示,表达经DK-PEG5-DUPA特异性剂程序化的包含38C2Fab片段的PUCR的细胞特异性结合至重组体PSMA,证明PUCR可顺利经程序化以靶向所关注抗原(即,PSMA)。

[0345] 实例10. 表达经靶向PSMA的特异性剂程序化的PUCR的KHYG-1自然杀伤细胞的细胞毒性活性

[0346] 为测定表达经DK-PEG5-DUPA特异性剂程序化的PUCR的KHYG-1 NK细胞是否能特异性杀死表达PSMA的细胞,如下文所述实施细胞毒性分析。用编码包含38C2 scFab的PUCR的构筑体转导KHYG-1 NK细胞(阐述于实例6中)。此实验达成约70%-80%的转导效率。

[0347] 简言的,通过实施下文所述的细胞毒性分析来测定野生型KHYG-1NK细胞(对照)或表达使用增加浓度的DK-PEG5-DUPA程序化的包含38C2 scFab的PUCR的KHYG-1细胞杀死PSMA阳性LNCaP细胞(ATCC[®] CRL-1740[™])或PSMA阴性PC-3细胞(ATCC[®] CRL-1435[™])的能力。

[0348] 使在KHYG-1 NK细胞的表面膜上表达的PUCR偶联(即,程序化)至特异性剂DK-PEG5-DUPA。在含有10%热不活化胎牛血清(FBS)及100IU/mL IL-2的RPMI-1640培养基中将野生型KHYG-1 NK细胞及经构筑体转导以表达包含38C2 scFab的PUCR的KHYG-1 NK细胞调节至 0.3×10^6 个细胞/mL(总计 20×10^6 个细胞)。在培育过夜后,使细胞沉淀并以 3×10^6 个细胞/mL再悬浮于含有10%热不活化FBS的RPMI-1640培养基中。为使经转导KHYG-1 NK细胞表达的PUCR程序化,通过在96孔深孔板中用含有10%热不活化FBS的RPMI实施 $1/2 \log$ 连续稀释来制备3.2nM、10nM、32nM、100nM、320nM或1000nM的特异性剂DK-PEG5-DUPA。在96孔v形底板中使用50 μ L特异性剂/孔一式三份测试各浓度的DK-PEG5-DUPA。在37℃下在加湿5%CO₂气

氛中培育1.5-2小时后,使KHYG-1 NK细胞沉淀并用含有10%热不活化FBS的RPMI洗涤以移除游离特异性剂,然后将50 μ L KHYG-1 NK细胞添加至分析板。

[0349] KHYG-1 NK细胞:该分析在96孔板中利用10:1的靶细胞比率及10,000个靶细胞/孔。简言之,使用萤火虫荧光素酶转导的前列腺癌靶细胞系LNCaP (ATCC[®] CRL-1740[™]), 其是PSMA阳性(且是在含有10%未经热不活化的FBS及0.5 μ g/mL嘌呤霉素的RPMI-1640培养基中培养);或PC-3 (ATCC[®] CRL-1435[™]), 其是PSMA阴性(且是在含有10%热不活化FBS及1.0 μ g/mL嘌呤霉素的RPMI-1640培养基中培养)。将细胞以 0.2×10^6 个细胞/mL的浓度再悬浮于含有10%热不活化FBS的新鲜RPMI-1640培养基中且将50 μ L细胞悬浮液在温和混合下添加至分析板。随后将单独的靶细胞或靶细胞加野生型KHYG-1细胞(对照)或表达经DK-PEG5-DUPA程序化的包含38C2 scFab的PUCR的KHYG-1 NK细胞在37 $^{\circ}$ C下在加湿5%CO₂培育器中培育2小时,之后添加100 μ L ONE Glo荧光素酶分析试剂(Promega目录号E6120)。将样品转移至白色96孔平底板以供使用PerkinElmer EnSpire多模式读板仪进行发光测量。使用GraphPad Prism软件分析数据。

[0350] 如图16A中所示,野生型KHYG-1NK细胞不能杀死PSMA阳性LNCaP细胞。与之相比,表达经DK-PEG5-DUPA程序化的PUCR的KHYG-1 NK细胞特异性杀死PSMA阳性LNCaP细胞。如图16B中所示,使用PSMA阴性PC-3细胞进一步确认表达经DK-PEG5-DUPA程序化的PUCR的KHYG-1 NK细胞的细胞毒性的特异性。在野生型KHYG-1 NK细胞及表达经DK-PEG5-DUPA程序化的PUCR的KHYG-1 NK细胞对PSMA阴性PC-3细胞的杀死未观察到显著差异。因此,此实验证明,表达经靶向PSMA的特异性剂程序化的PUCR的NK细胞可成功地用于特异性靶向并杀死PSMA阳性细胞。

[0351] 表8.序列总结

[0352]

SEQ ID NO:	说明	序列
1	信号肽氨基酸序列	MEWSWVFLFFLSVTTGVHS
2	Myc-标签氨基酸序列	EQKLISEEDL
3	鼠类38C2 scFv氨基酸序列	DVVM TQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSLLHT YGPSYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYFCSQ GTHLPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGS EVKLVESGGGLVQPGGTMKLSCEISGLTFRNY WMSWVRQSPEKGLEWVAEIRLRSDNYATHY AESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMNSLRTE DTGIYYCKTYFYFSFSYWGQGTLVTVSA
4	人源化38C2 scFv氨基酸序列	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLHTY GPSYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFCSQ GTHLPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYWMSWVRQSPEKGLEWVSEIRLRSDNYATHY AE SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT GIYYCKTYFYFSFSYWGQGTLVTVSS

[0353]

5	CD8铰链氨基酸序列	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFA
6	CD3 ζ 跨膜域氨基酸序列	LDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVK
7	CD28细胞内域氨基酸序列	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA PPRDFAAAYRS
8	CD3 ζ 细胞内域氨基酸序列	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
9	具有Myc-标签氨基酸序列的鼠类PUCR	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDVVMQTPLSLP VRLGDQASISCRSSQSLLHTYGSPYLNWYLQK PGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFT LRISRVEAEDLGVYFCSQGTHLPYTFGGGTKL EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVKLVESGGGLVQ PGGTMKLSCEISGLTFERNYWMSWVRQSPEKG LEWVAEIRLRSDNYATHYAESVKGKFTISRDD SKSRLYLQMNSLRTEDTGIYYCKTYFYFSFY WGQGTLVTVSAEQKLISEEDLAKPTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFALDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKRS KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10	具有Myc-标签及信号肽氨基酸序	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSELQMTQSPSSLS ASVGDRVITICRSSQSLLHTYGSPYLNWYLQ

[0354]

	列的人源化 PUCR	KPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQSPEK GLEWVSEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTGIYYCKTYFYSFS YWGQGTLLTVSSEQLISEEDLAKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFALDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKRS KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
11	信号肽核酸序列	ATGGAGTGGTCCTGGGTGTTCTGTTCTTTC TGTCCTGACCACCGGTGTCCAC
12	Myc-标签核酸序 列	GAGCAGAACTCATTCTGAAGAGGACCTT
13	鼠类38C2 scFv 核酸序列	GATGTAGTTATGACCCAGACGCCTCTTCTC TCCCCGTCCGGCTCGGAGACCAAGCCTCCA TCTCTTGCCGAAGTTCACAATCATTGTTGCA CACGTATGGATCCCCATATCTGAATTGGTAT CTCCAAAAGCCTGGACAGTCCCCCAAGCTG TTGATCTATAAAGTAAGTAATAGATTTTCCG GCGTTCCTGACCGCTTCAGTGGCTCAGGAA GCGGTACGGATTTTACTCTTCGGATTTCCCG CGTCGAAGCTGAAGATCTTGGTGTCTATTTT TGTTCTCAGGGAACGCACCTGCCATACACA TTCGGAGGGGGCACTAAGCTCGAAATCAAG GGCGGGGGCGGGTCAGGTGGTGGGGGCAG

[0355]

		CGGCGGGGGTGGCAGCGAGGTTAAGCTTGT GGAAAGTGGAGGCGGGCTTGTGCAGCCGGG CGGGACCATGAAACTGTCCTGCGAGATAAG TGGACTCACTTTTAGGAACTATTGGATGAG CTGGGTGCGACAGTCCCCGAGAAGGGCCT TGAATGGGTTGCCGAAATACGGCTTCGATC AGACAACTATGCGACGCACTACGCTGAAAG CGTCAAAGGAAAATTCATCATCAGCCGGGA CGACAGCAAGAGTAGACTTTATTTGCAGAT GAATAGTTTGAGGACGGAAGATACGGGAAT ATATTATTGCAAAACATACTTCTATTCAATTT TCATACTGGGGTCAGGGCACGTTGGTTACG GTTTCAGCC
14	人源化38C2 scFv核酸序列	GAGCTTCAGATGACCCAAAGTCCCAGCTCT CTCTCCGCCTCTGTCTGGAGACAGGGTCACG ATAACCTGTCTGAAGTAGCCAGAGTCTTCTC CATACTTACGGAAGCCCATATCTTAACTGGT ATCTTCAGAAACCCGGTCAATCACCCAAGC TGCTGATATATAAAGTGTCTAACCGGTTTTT TGGTGTGCCGAGTCGATTTTCAGGATCAGG GAGCGGCACGGATTTCACTCTTACGATCTCT AGTTTGCAACCTGAGGATTTTGCTGTATACT TTTGCAGCCAAGGTACTCATCTTCCTTATAC GTTCGGAGGGGGTACCAAAGTAGAAATTAA AGGAGGAGGAGGGTCCGGAGGAGGGGGCA GCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTACAACCTC GTGGAATCTGGCGGGGGGCTGGTGCAACCT GGGGGTTCTCTCCGCCTGAGCTGTGCTGCAT CCGGCTTCACCTTTTCTAATTATTGGATGAG CTGGGTACGGCAGTCACCGGAGAAAGGTCT

[0356]

		GGAGTGGGTGTCTGAGATACGACTTAGATC AGACAACTACGCGACGCATTACGCCGAGAG CGTGAAAGGAAGATTTACCATAAGCAGAGA CAATTCAAAAAACACCCTGTACCTCCAAAT GAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGGGAT ATATTACTGTAAAACCTACTTTTACAGTTTT AGTTATTGGGGCCAGGGAACGCTTGTAAC GTTAGCTCT
15	CD8铰链核酸序 列	GCTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGA CCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCG CAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGC CGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACAC GAGGGGGCTGGACTTCGCC
16	CD3 ζ 跨膜域核 酸序列	CTCGATCCGAAGTTGTGCTACCTGTTGGACG GCATTCTCTTTATATACGGTGTCATCCTGAC AGCGTTGTTTCTCCGAGTGAAG
17	CD28细胞内域 核酸序列	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCC GGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGC TCC
18	CD3 ζ 细胞内域 核酸序列	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG

[0357]

		CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC CCCCTCGCTAA
19	具有Myc-标签核 酸序列的鼠类 PUCR	GATGTAGTTATGACCCAGACGCCTCTTTCTC TCCCCGTCCGGCTCGGAGACCAAGCCTCCA TCTCTTGCCGAAGTTCACAATCATTGTTGCA CACGTATGGATCCCCATATCTGAATTGGTAT CTCCAAAAGCCTGGACAGTCCCCCAAGCTG TTGATCTATAAAGTAAGTAATAGATTTTCCG GCGTTCCTGACCGCTTCAGTGGCTCAGGAA GCGGTACGGATTTTACTCTTCGGATTTCCCG CGTCGAAGCTGAAGATCTTGGTGTCTATTTT TGTTCTCAGGGAACGCACCTGCCATACACA TTCGGAGGGGGGCACTAAGCTCGAAATCAAG GGCGGGGGCGGGTCAGGTGGTGGGGGCAG CGGCGGGGGTGGCAGCGAGGTAAAGCTTGT GGAAAGTGGAGGCGGGCTTGTGCAGCCGGG CGGGACCATGAACTGTCCTGCGAGATAAG TGGACTCACTTTTAGGAACTATTGGATGAG CTGGGTGCGACAGTCCCCCGAGAAGGGCCT TGAATGGGTTGCCGAAATACGGCTTCGATC AGACAACTATGCGACGCACTACGCTGAAAG CGTCAAAGGAAAATTCACTATCAGCCGGGA CGACAGCAAGAGTAGACTTTATTGTCAGAT GAATAGTTTGAGGACGGAAGATACGGGAAT ATATTATTGCAAAACATACTTCTATTCATTT TCATACTGGGGTCAGGGCACGTTGGTTACG GTTTCAGCCGAGCAGAAGCTCATTTCGAA

[0358]

		GAAGATCTCGCAAAGCCGACAACGACGCCG GCACCCCGGCCTCCCACCCCGCCCCACT ATAGCTAGTCAACCTCTTTCCTGCGCCCTG AAGCGTGTAGACCTGCAGCCGGGGGAGCAG TCCATACGCGCGGACTTGATTTGCCCCTCGA CCCCAAGTTGTGTTACCTTTTGGACGGGATC CTCTTCATTTACGGTGTGCTTCTTACTGCCTT GTTTCTCAGGGTAAAAAGGTCTAAGAGATC CCGACTCCTCCATTCTGACTACATGAATATG ACACCGAGGAGACCGGGACCAACTCGGAA GCATTATCAGCCATACGCGCCCCCCCCGCGA TTTCGCGGCATACAGGTCAAGAGTCAAGTT CTCCCGCAGCGCAGACGCGCCCGCTTATCA GCAAGGTCAAAATCAACTCTACAATGAGCT CAATCTGGGACGACGGGAGGAGTACGATGT CCTCGACAAGAGGAGAGGTCGGGATCCTGA AATGGGTGGCAAACCCAGCGACGCAAGA ATCCTCAGGAGGGTCTCTACAACGAGCTGC AAAAAGATAAAATGGCGGAGGCGTATAGT GAAATAGGGATGAAAGGGGAAAGACGCCG GGGAAAAGGACATGATGGTCTGTATCAGGG TCTGTCAACAGCTACTAAAGACACATACGA TGCGCTGCACATGCAAGCGTTGCCGCCGAG G
20	具有Myc-标签核 酸序列的人源化 PUCR	GAGCTTCAGATGACCCAAAGTCCCAGCTCT CTCTCCGCCTCTGTCTGGAGACAGGGTCACG ATAACCTGTCTGAAGTAGCCAGAGTCTTCTC CATACTTACGGAAGCCCATATCTTAACTGGT ATCTTCAGAAACCCGGTCAATCACCCAAGC TGCTGATATATAAAGTGTCTAACCGGTTTTT

[0359]

TGGTGTGCCGAGTCGATTTTCAGGATCAGG
GAGCGGCACGGATTTCACTCTTACGATCTCT
AGTTTGCAACCTGAGGATTTTGCTGTATACT
TTTGCAGCCAAGGTACTCATCTTCCTTATAC
GTTTCGGAGGGGGTACCAAAGTAGAAATTAA
AGGAGGAGGAGGGTCCGGAGGAGGGGGCA
GCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTACAATC
GTGGAATCTGGCGGGGGGCTGGTGCAACCT
GGGGGTTCTCTCCGCCTGAGCTGTGCTGCAT
CCGGCTTCACCTTTTCTAATTATTGGATGAG
CTGGGTACGGCAGTCACCGGAGAAAGGTCT
GGAGTGGGTGTCTGAGATACGACTTAGATC
AGACAACTACGCGACGCATTACGCCGAGAG
CGTGAAAGGAAGATTTACCATAAGCAGAGA
CAATTCAAAAAACACCCTGTACCTCCAAAT
GAATAGCCTCAGGGCGGAAGATACTGGGAT
ATATTACTGTAAAACCTACTTTTACAGTTTT
AGTTATTGGGGCCAGGGAACGCTTGTAAC
GTTAGCTCTGAGCAGAAGCTCATTTCGAA
GAAGATCTCGCAAAGCCGACAACGACGCCG
GCACCCCGGCCTCCCACCCCGCCCCACT
ATAGCTAGTCAACCTCTTTCACTGCGCCCTG
AAGCGTGTAGACCTGCAGCCGGGGGAGCAG
TCCATACGCGCGGACTTGATTTGCCCCTCGA
CCCCAAGTTGTGTTACCTTTTGGACGGGATC
CTCTTCATTACGGTGTCAATTCTTACTGCCTT
GTTTCTCAGGGTAAAAAGGTCTAAGAGATC
CCGACTCCTCCATTCTGACTACATGAATATG
ACACCGAGGAGACCGGGACCAACTCGGAA
GCATTATCAGCCATACGCGCCCCCCCCGCGA
TTTCGCGGCATACAGGTCAAGAGTCAAGTT

[0360]

		CTCCCGCAGCGCAGACGCGCCCGCTTATCA GCAAGGTCAAAATCAACTCTACAATGAGCT CAATCTGGGACGACGGGAGGAGTACGATGT CCTCGACAAGAGGAGAGGTCGGGATCCTGA AATGGGTGGCAAACCCAGCGACGCAAGA ATCCTCAGGAGGGTCTCTACAACGAGCTGC AAAAAGATAAAATGGCGGAGGCGTATAGT GAAATAGGGATGAAAGGGGAAAGACGCCG GGGAAAAGGACATGATGGTCTGTATCAGGG TCTGTCAACAGCTACTAAAGACACATACGA TGCGCTGCACATGCAAGCGTTGCCGCCGAG G
21	连接体	(Gly4Ser) _n , 其中n是等于或大于1的正整数(SEQ ID NO: 21)
22	连接体	(Gly ₄ Ser) ₄
23	连接体	(Gly ₄ Ser) ₃
24	人类CD28的跨 膜域	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
25	人类CD28的跨 膜域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLF PGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
26	4-1BB细胞内域	KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
27	4-1BB细胞内域 核酸序列	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATA TTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGT GAACTG
28	CD8铰链氨基酸 序列	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAXRPA AGGAVHTRGLDFA, 其中X是除半胱氨酸以外

[0361]

		的任何氨基酸
29	CD8铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACD
30	CD8铰链核酸序列	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACA CCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCG GCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCT GGACTTCGCCTGTGAT
31	连接体	(Gly ₄ Ser) ₆
32	连接体	(Gly ₄ Ser) ₉
33	连接体	(Gly ₄ Ser) ₁₂
34	连接体	(Gly ₄ Ser) ₁₅
35	连接体	(Gly ₄ Ser) ₃₀
36	连接体	(Gly ₄ Ser) ₄₅
37	连接体	(Gly ₄ Ser) ₆₀
38	CD3 ζ 跨膜域序列的疏水延伸段	LCYLLDGILFIYGVILTALFL
39	Myc-标签核酸序列	GAGCAGAAGCTGATTAGCGAAGAGGACCTG
40	人源化38C2可变 κ 重链	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLHTY GSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYFCSQGTH LPYTFGGGTKVEIK
41	人类 κ 轻链恒定	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
42	人源化38C2可变重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY WMSWVRQSPEKGLEWVSEIRLRSDNYATHY

[0362]

		AESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT GIYYCKTYFYSF SYWGQGLTVTVSS
43	人类 γ 1重链恒定 域1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT
44	具有信号肽的全 长人源化38C2 scFab	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSELQMTQSPSSLS ASVGDRVITICRSSQSLLHTYGPSYLNWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGSG GGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWM SWVRQSPKGLEWVSEIRLRSDNYATHYAES VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTGIYY CKTYFYSF SYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH T
45	包含38C2 scFab 的全长PUCR的 氨基酸序列	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSELQMTQSPSSLS ASVGDRVITICRSSQSLLHTYGPSYLNWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL

[0363]

		NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGGSGGGSG GGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWM SWVRQSPVKGLEWVSEIRLRSDNYATHYAES VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTGIYY CKTYFYFSYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
46	信号肽核酸序列	ATGGAATGGAGTTGGGTGTTCTTTTCTTTC TGAGTGTCACCACCGGAGTGCAC
47	人源化38C2 scFab核酸序列	AGCGAACTGCAGATGACCCAGTCCCCATCC AGTCTGAGCGCTAGCGTTGGTGACAGAGTT ACTATCACCTGCCGCTCTTCACAGAGCCTGT TGCACACTTACGGCTCTCCTTACCTGAACTG GTATCTTCAGAAGCCTGGCCAAAGCCCTAA GCTGCTCATCTACAAGGTGTCTAACAGGTTC TCCGGGGTTCCGTCCCGCTTTTCAGGGAGCG GGTCAGGAACAGACTTCACCTTGACAATCT CAAGCCTCCAGCCCGAGGATTTTGCCGTCT

[0364]

ATTTCTGCTCACAAGGCACACATCTGCCGTA
TACCTTTGGGGGCGGGACAAAAGTCGAGAT
CAAAAGGACCGTCGCTGCACCATCCGTGTT
TATCTTCCCACCAAGTGACGAACAGCTCAA
GAGCGGTACTGCCTCCGTTGTTTGTCTGCTG
AACAACTTCTATCCAAGGGAAGCAAAGGTG
CAATGGAAAGTAGACAACGCTCTGCAGTCA
GGCAACTCCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAG
GATAGCAAAGATTCAACATACAGCCTGAGC
AGCACCTCACCCTGAGTAAGGCCGATTAC
GAGAAGCACAAGGTTTACGCCTGCGAGGTG
ACCCACCAGGGCCTTTCATCCCCAGTCACC
AAATCTTTTAACCGCGGCGAATGCGGGGGA
GGCTCTGGTGGAGGCGGTTCTGGAGGGGGC
TCAGGAGGAGGCGGTAGCGGCGGTGGTAGT
GGGGGTGGCGGATCTGGCGGAGGTGGCTCA
GGAGGAGGTAGCGGCGGCGGGGGCAGCGA
GGTCCAGCTGGTAGAGTCAGGTGGAGGATT
GGTGCAGCCCGGCGGCAGTCTTAGACTCAG
CTGTGCGGCCAGCGGATTTACTTTCTCAAAT
TATTGGATGTCTTGGGTCAGGCAGAGCCCA
GAGAAAGGCCTGGAATGGGTGTCAGAGATC
CGACTGAGAAGCGATAATTACGCGACTCAT
TATGCGGAAAGCGTTAAAGGTCGGTTCAT
ATTCACGAGATAATTCTAAGAATACCTTT
ATCTGCAGATGAACAGCTTGCGCGCCGAGG
ACACAGGCATCTACTACTGTAAAACTTACTT
CTATTCTTTTTCTACTGGGGACAGGGGACT
CTCGTTACAGTCAGTAGCGCCTCCACCAAG
GGTCCTAGTGTCTTTCCCCTGGCCCCCTCAT
CCAAGTCCACGTCAGGAGGCACCGCGGCTC

[0365]

		TGGGCTGTCTGGTCAAAGACTACTTTCCTGA GCCAGTCACCGTGTCTGGAATTCCGGCGC GCTTACTTCTGGCGTGCACACTTTCCTCCGCC GTCCTCCAGAGCAGTGGGCTGTATTCCCTGT CTCCGTAGTCACTGTGCCAAGCTCCAGTCT GGGAACCCAGACCTATATTTGTAATGTGAA TCATAAGCCGAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAACCGAAGTCATGTGACAAAAC CCACACT
48	包含38C2 scFab 的全长PUCR的 核酸序列	ATGGAATGGAGTTGGGTGTTCTTTTCTTTC TGAGTGTCAACCACCGGAGTGCACAGCGAAC TGCAGATGACCCAGTCCCCATCCAGTCTGA GCGCTAGCGTTGGTGACAGAGTTACTATCA CCTGCCGCTCTTCACAGAGCCTGTTGCACAC TTACGGCTCTCCTTACCTGAACTGGTATCTT CAGAAGCCTGGCCAAAGCCCTAAGCTGCTC ATCTACAAGGTGTCTAACAGGTTCTCCGGG GTTCCGTCCCGCTTTTCAGGGAGCGGGTCA GGAACAGACTTCACCTTGACAATCTCAAGC CTCCAGCCCGAGGATTTTGCCGTCTATTTCT GCTCACAAGGCACACATCTGCCGTATACCT TTGGGGGCGGGACAAAAGTCGAGATCAAA AGGACCGTCGCTGCACCATCCGTGTTTATCT TCCCACCAAGTGACGAACAGCTCAAGAGCG GTA CTGCCTCCGTTGTTTGTCTGCTGAACAA CTTCTATCCAAGGGAAGCAAAGGTGCAATG GAAAGTAGACAACGCTCTGCAGTCAGGCAA CTCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGATAG CAAAGATTCAACATACAGCCTGAGCAGCAC CCTCACCTGAGTAAGGCCGATTACGAGAA GCACAAGGTTTACGCCTGCGAGGTGACCCA

[0366]

CCAGGGCCTTTCATCCCCAGTCACCAAATCT
TTTAACCGCGGCGAATGCGGGGGAGGCTCT
GGTGGAGGCGGTTCTGGAGGGGGCTCAGGA
GGAGGCGGTAGCGGCGGTGGTAGTGGGGGT
GGCGGATCTGGCGGAGGTGGCTCAGGAGGA
GGTAGCGGCGGCGGGGGCAGCGAGGTCCA
GCTGGTAGAGTCAGGTGGAGGATTGGTGCA
GCCCCGGCGGCAGTCTTAGACTCAGCTGTGC
GGCCAGCGGATTTACTTTCTCAAATTATTGG
ATGTCTTGGGTCAGGCAGAGCCCAGAGAAA
GGCCTGGAATGGGTGTCAGAGATCCGACTG
AGAAGCGATAATTACGCGACTCATTATGCG
GAAAGCGTTAAAGGTCGGTTCACTATTTCA
CGAGATAATTCTAAGAATACCTTTATCTGC
AGATGAACAGCTTGCGCGCCGAGGACACAG
GCATCTACTACTGTAAACTTACTTCTATTCT
TTTTTCCTACTGGGGACAGGGGACTCTCGTT
ACAGTCAGTAGCGCCTCCACCAAGGGTCCT
AGTGTCTTTCCCCTGGCCCCCTCATCCAAGT
CCACGTCAGGAGGCACCGCGGCTCTGGGCT
GTCTGGTCAAAGACTACTTTCCTGAGCCAGT
CACCGTGTCTGGAATTCGCGCGCCTTACT
TCTGGCGTGCACACTTTCCCCGCCGTCCTCC
AGAGCAGTGGGCTGTATTCCCTGTCTTCCGT
AGTCACTGTGCCAAGCTCCAGTCTGGGAAC
CCAGACCTATATTTGTAATGTGAATCATAA
GCCGAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGG
TGGAACCGAAGTCATGTGACAAAACCCACA
CTGCTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGC
GACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGT
CGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGT

[0367]

		GCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCAC ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCCTAGGAAA ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAG ACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCC ATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTC CCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTG GGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGC TTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT ATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC AGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATG ACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAG CATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC TTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTC AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAG CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGAT TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCA AGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCC TTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA
49	抗PSMA克隆 A11重链可变域	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY WMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARVWDYYYDSSGDAFDIWGQGTMVT VSS
50	抗PSMA克隆 A11轻链可变域	VIWMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSW LAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQGVPSRFS

[0368]

		GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPL TFGGGTKVDIK
51	IL13R氨基酸序列	MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEIKVN PPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLDHFKEC TVEYELKYRNIGSETWKTIITKNLHYKDGF DL NKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTY WISPGIPETKVQDMDCVYYNWQYLLCSWK PGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIK ADGQNIGCRFPYLEASDYKDFYICVNGSSENK PIRSSYFTFQLQNIVKPLPPVYLTFTRESSCEIK LKWSIPLGPIPARCFDYEIEIREDDTTLVTATV ENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDG IWSEWSDKQCWEGEDLSKKTLLRFWLPFGFIL ILVIFVTGLLLRKPNTPKMIPEFFCDT
52	抗VEGFR2 VK-B8轻链可变域	ETTLTQSPATLSVSPGERATVSCRASQSLGSNL GWFQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGS GSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYNDWPITF GQGTRLEIK
53	抗VEGFR2 VK-B8重链可变域	MAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAYGGT FGSYGVSWVRRAPGQGLEWMGRLIPFGTRD YAQKFQGRVTLTADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCARDGDYYGSGSYGMDVWGQGT LTVSS
54	多GlySer连接体	GGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGGSGGG GSGGGSGGGGS
55	杂合CD8及CD28 铰链氨基酸序列	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP
56	杂合CD8及CD28 铰链氨基酸序列 的CD8部分	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFA

[0369]

57	铰链连接体氨基酸序列	PR
58	杂合CD8及CD28铰链氨基酸序列的CD28部分	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP
59	CD3 ζ 细胞内域氨基酸序列	RVKFSSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
60	杂合CD8及CD28铰链核酸序列	GCTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGCA CCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCG CAGCCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGC CGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACAC GAGGGGGCTGGACTTCGCCCCCTAGGAAAAT TGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGAC AATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCAT GTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCC CTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCC
61	CD28跨膜域核酸序列	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCC TGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC CTTTATTATTTTCTGGGTG
62	CD3 细胞内域核酸序列	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA

[0370]

		CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC CCCCTCGCTAA
63	Myc-标签核酸序列	GAGCAGAAGCTGATTAGCGAAGAGGACCTG
64	SS-14 (生长抑素类似物)	Ala-Gly-环(Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)
65	OC (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-Phe3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
66	TOC (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
67	TATE (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
68	NOC (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
69	NOC-ATE (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-1-Nal3-D-Trp4- Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
70	BOC (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
71	BOC-ATE (生长抑素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
72	KE108 (生长抑素类似物)	Tyr-环(DAB-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe)
73	LM3 (生长抑素类似物)	p-Cl-Phe-环(D-Cys-Tyr-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys)D-Tyr-NH ₂
74	BN (铃蟾素类似物)	pGlu1-Gln2-Arg3-Leu4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH ₂
75	RP527 (铃蟾素类似物)	N3S-Gly-5-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH ₂]

[0371]

76	迪莫素1 (铃蟾素类似物)	N40-1-bz1g0[D-Phe6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu-NHEt13]
77	迪莫素4 (铃蟾素类似物)	N4-[Pro1-Gln2-Arg3-Tyr4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Nle14-NH2]
78	BBS-38 (铃蟾素类似物)	(N α His)Ac- β -Ala- β -Ala-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Cha13-Nle14-NH2]
79	BAY 86-4367 (铃蟾素类似物)	3-氰基-4-三甲铵-苯甲酰基-Ala(SO3H)-Ala(SO3H)-Ava[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-NMeGly11-His12-Sta13-Leu14-NH2]
80	MG (微小胃泌素类似物)	Leu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH2
81	MGO (微小胃泌素类似物)	D-Glu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH2
82	MG11 (微小胃泌素类似物)	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
83	H2-Met (微小胃泌素类似物)	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
84	H2-Nle (微小胃泌素类似物)	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2
85	拟胃泌素(微小胃泌素类似物)	N4-D-Glu-(Glu)5-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
86	环-MG1 (微小胃泌素类似物)	c(γ -D-Glu-Ala-Tyr-D-Lys)-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
87	MGD5 (微小胃泌素类似物)	Gly-Ser-Cys(琥珀酰亚氨基丙酰基-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2)-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2
88	布舍瑞林(GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu)6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
89	戈舍瑞林(GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu)6-Leu7-Arg8-Pro9-AzGly10-NH2

[0372]

90	柳培林(GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Leu6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
91	那法瑞林(GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D- Nal(2)6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
92	曲普瑞林(GnRH类似物)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Trp6- Leu7-Arg8-Pro9-Gly10-NH2
93	阿巴瑞克(GnRH类似物)	Ac-D-Ala1-D-Cpa2-D-Ala3-Ser4-Tyr5-D-Asp6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
94	阿西林(GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Aph(Ac)5-D-Aph(Ac)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
95	安雷利克斯(GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Tyr5-D-Hci6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
96	安肽(GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Lys(Nic)5-D-Lys(Nic)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
97	阿察林B (GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Aph(Atz)5-D-Aph(Atz)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
98	西曲瑞克(GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Tyr5-D-Cit6-Leu7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2
99	地加瑞克(GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Aph(L-氢化乳清酰基)5-D-Aph (胺甲酰基)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
100	加尼瑞克(GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-Tyr5-D-hArg(Et2)6-Leu7-hArg(Et2) 8-Pro9-D-Ala10-NH2
101	奥扎瑞克(GnRH类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pa13-Ser4-N-MeTyr5-D-hCit6-Nle7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2
102	具有Myc-标签且无信号肽氨基酸序列的鼠类PUCR	DVVMTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSLHT YGSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYFCSQG THLPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGS EVKLVESGGGLVQPGGTMKLSCEISGLTFRNY

[0373]

		WMSWVRQSPEKGLEWVAEIRLRSDNYATHY AESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMNSLRTEDTG IYYCKTYFYFSFSYWGQGTTLVTVSAEQKLISEE DLAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFALDPKLCYLLDGILFIYGV ILTALFLRVKRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
103	具有Myc-标签且 无信号肽氨基酸 序列的人源化 PUCR	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLLHTY GSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFCSQGTH LPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYW MSWVRQSPEKGLEWVSEIRLRSDNYATHYAE SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTGIY YCKTYFYFSFSYWGQGTTLVTVSSEQKLISEEDL AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFALDPKLCYLLDGILFIYGVI LTALFLRVKRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
104	无信号肽氨基酸 序列的全长人源	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLLHTY GSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPS

[0374]

	化38C2 scFab	RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFCSQGTH LPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYWMSWVRQSPEKGLEWVSEIRLRSD NYATHYAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTGIYYCKTYFYSFSYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT
105	包含38C2 scFab 且无信号肽氨基 酸序列的全长 PUCR	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLHTY GSPYLNWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFCSQGTH LPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYWMSWVRQSPEKGLEWVSEIRLRSD NYATHYAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTGIYYCKTYFYSFSYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQ

[0375]

		PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPS KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
106	包含38C2 scFab 且无信号肽核酸 序列的全长 PUCR	AGCGAACTGCAGATGACCCAGTCCCCATCC AGTCTGAGCGCTAGCGTTGGTGACAGAGTT ACTATCACCTGCCGCTCTTCACAGAGCCTGT TGCACACTTACGGCTCTCCTTACCTGAACTG GTATCTTCAGAAGCCTGGCCAAAGCCCTAA GCTGCTCATCTACAAGGTGTCTAACAGGTTC TCCGGGGTTCCGTCCCGCTTTTCAGGGAGCG GGTCAGGAACAGACTTCACCTTGACAATCT CAAGCCTCCAGCCCGAGGATTTTGCCGTCT ATTTCTGCTCACAAGGCACACATCTGCCGTA TACCTTTGGGGGCGGGACAAAAGTCGAGAT CAAAAGGACCGTCGCTGCACCATCCGTGTT TATCTTCCCACCAAGTGACGAACAGCTCAA GAGCGGTACTGCCTCCGTTGTTTGTCTGCTG AACAACTTCTATCCAAGGGAAGCAAAGGTG CAATGGAAAGTAGACAACGCTCTGCAGTCA GGCAACTCCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAG GATAGCAAAGATTCAACATACAGCCTGAGC AGCACCTCACCTGAGTAAGGCCGATTAC GAGAAGCACAAGGTTTACGCCTGCGAGGTG ACCCACCAGGGCCTTTCATCCCCAGTCACC AAATCTTTTAACCGCGGCGAATGCGGGGGA GGCTCTGGTGGAGGCGGTTCTGGAGGGGGC

[0376]

TCAGGAGGAGGCGGTAGCGGCGGTGGTAGT
GGGGGTGGCGGATCTGGCGGAGGTGGCTCA
GGAGGAGGTAGCGGCGGCGGGGGCAGCGA
GGTCCAGCTGGTAGAGTCAGGTGGAGGATT
GGTGCAGCCCCGGCGGCAGTCTTAGACTCAG
CTGTGCGGCCAGCGGATTTACTTTTCTCAAAT
TATTGGATGTCTTGGGTCAGGCAGAGCCCA
GAGAAAGGCCTGGAATGGGTGTCAGAGATC
CGACTGAGAAGCGATAATTACGCGACTCAT
TATGCGGAAAGCGTTAAAGGTCGGTTCACT
ATTCACGAGATAATTCTAAGAATACCCTTT
ATCTGCAGATGAACAGCTTGCGCGCCGAGG
ACACAGGCATCTACTACTGTAAAACTTACTT
CTATTCTTTTTCTACTGGGGACAGGGGACT
CTCGTTACAGTCAGTAGCGCCTCCACCAAG
GGTCCTAGTGTCTTTCCCCTGGCCCCCTCAT
CCAAGTCCACGTCAGGAGGCACCGCGGCTC
TGGGCTGTCTGGTCAAAGACTACTTTCCTGA
GCCAGTCACCGTGTCTTGAATTCCGGCGC
GCTTACTTCTGGCGTGCACACTTCCCCGCC
GTCCTCCAGAGCAGTGGGCTGTATTCCCTGT
CTTCCGTAGTCACTGTGCCAAGCTCCAGTCT
GGGAACCCAGACCTATATTTGTAATGTGAA
TCATAAGCCGAGCAACACCAAGGTGGACAA
GAAGGTGGAACCGAAGTCATGTGACAAAAC
CCACACTGCTAAGCCCACCACGACGCCAGC
GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCAT
CGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGA
GGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCTAG
GAAAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTAC

[0377]

CTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATT ATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCA AGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCT GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGG AGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAAC ATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGC GACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAG TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT GAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCA GAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG GGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGT CTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCT AA
--

序列表

<110> 索伦托治疗有限公司

<120> 可程序化的通用细胞受体及其使用方法

<130> 126591-00120

<150> US 62/245,978

<151> 2015-10-23

<150> US 62/382,691

<151> 2016-09-01

<160> 106

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Signal peptide amino acid sequence

[0001] <400> 1

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Myc-tag amino acid sequence

<400> 2

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 3

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Murine 38C2 scFv amino acid sequence

<400> 3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr

20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly

85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

[0002]

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

115 120 125

Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Thr

130 135 140

Met Lys Leu Ser Cys Glu Ile Ser Gly Leu Thr Phe Arg Asn Tyr Trp

145 150 155 160

Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

165 170 175

Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

180 185 190

Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg Leu

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr

210 215 220

Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ala

245

<210> 4

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: humanized 38C2 scFv amino acid sequence

<400> 4

Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr

20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

[0003]

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly

85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

115 120 125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser

130 135 140

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp

145 150 155 160

Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

165 170 175

Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

180 185 190

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr

210 215 220
Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ser
245
<210> 5
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(46)
<223> CD8 hinge amino acid sequence
<400> 5
Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
1 5 10 15
Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
[0004] 20 25 30
Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
35 40 45
<210> 6
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)
<223> CD3-zeta transmembrane domain amino acid sequence
<400> 6
Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr
1 5 10 15
Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys
20 25
<210> 7

<211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(41)
<223> CD28 intracellular domain amino acid sequence
<400> 7
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40
<210> 8
<211> 113
<212> PRT
[0005] <213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(113)
<223> CD3-zeta intracellular domain amino acid sequence
<400> 8
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln 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 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
50 55 60
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
65 70 75 80
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr

85 90 95
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
100 105 110
Arg
<210> 9
<211> 502
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Murine PUCR with Myc-tag amino acid sequence
<400> 9
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30
Arg Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45
[0006] Leu His Thr Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
100 105 110
Ser Gln Gly Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125
Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
145 150 155 160
Gly Gly Thr Met Lys Leu Ser Cys Glu Ile Ser Gly Leu Thr Phe Arg
165 170 175
Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu

[0007]

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

450 455 460

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

465 470 475 480

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met

485 490 495

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

500

<210> 10

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Humanized PUCR with Myc-tag with signal peptide amino acid sequence

<400> 10

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

[0008]

Val His Ser Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

35 40 45

Leu His Thr Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys

100 105 110

Ser Gln Gly Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

[0009]

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

420 425 430

Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu

435 440 445

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile

450 455 460

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

465 470 475 480

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met

485 490 495

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

500

<210> 11

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

[0010]

<223> Synthetic: Signal peptide nucleic acid sequence

<400> 11

atggagtggc cctgggtgtt cctgtcttt ctgtcctga ccaccggtgt ccac 54

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Myc-tag nucleic acid sequence

<400> 12

gagcagaaac tcatttctga agaggacctt 30

<210> 13

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: murine 38C2 scFv nucleic acid sequence

<400> 13

gatgtagta tgaccagac gcctcttct cccccgtcc ggctcggaga ccaagcctcc 60
 atctcttccc gaagttcaca atcattgttg cacacgtatg gatccccata tctgaattgg 120
 tatctccaaa agcctggaca gtcccccaag ctgtgatct ataaagtaag taatagattt 180
 tccggcggtc ctgaccgctt cagtggctca ggaagcggta cggattttac tctcggatt 240
 tcccgcgtcg aagctgaaga tcttggtgtc tatttctgtt ctcagggaac gcacctgcca 300
 tacacattcg gagggggcac taagctcgaa atcaagggcg ggggcgggtc aggtggtggg 360
 ggcagcggcg ggggtggcag cgaggtaag ctgttgaaa gtggaggcgg gcttgtcag 420
 ccgggcggga ccatgaaact gtctgcgag alaagtgac tcacttttag gaactattgg 480
 atgagctggg tgcacagtc ccccgagaag ggccttgaat gggttgccga aatacggctt 540
 cgalcagaca actatgcgac gcactacgt gaaagcgtca aaggaaaatt cactatcagc 600
 cgggacgaca gcaagagtag actttattg cagatgaata gtttggagac ggaagatacg 660
 ggaatatatt attgcaaaac atacttctat tcatttcat actgggggtca gggcacgttg 720
 gttacggttt cagec 735

<210> 14

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0011]

<220>

<223> Synthetic: humanized 38C2 scFv nucleic acid sequence

<400> 14

gagcttcaga tgaccctaaag tcccagctct ctctccgct ctgtcggaga cagggtcacg 60
 ataacctgtc gaagtagcca gactctctc catacttacg gaagcccata tcttaactgg 120
 tatcttcaga aaccgggtca atcaccctaa ctgtgatat ataaagtgtc taaccggttt 180
 tctgggtgtc cgagtcgatt ttcaggatca gggagcggca cggatttcac tcttacgac 240
 tctagtgtgc aacctgagga ttttctgtg tacttttgc gccaaaggta tcatcttct 300
 tatagttcg gaggggggtac caaagtagaa attaaaggag gaggagggtc cggaggaggg 360
 ggcagcggag gaggaggctc agaagtacaa ctctgtggaat ctggcggggg gctggtgcaa 420
 cctgggggtt ctctccgct gagctgtgct gcctccggt tcacctttc taattattgg 480
 atgagctggg tacggcagtc accggagaaa ggtctggagt ggggtgtctg gatacgactt 540
 agalcagaca actacgcgac gcattacgc gagagcgtga aaggaagatt taccataagc 600
 agagacaatt caaaaaacac cctglacct caaatgaata gcctcagggc ggaagatact 660
 gggatatatt actgtaaaac ctactttac agttttagt attggggcca gggaacgctt 720
 gtaactgtta gctct 735

<210> 15

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CD8 hinge nucleic acid sequence

<400> 15

gctaagccca ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaaacac cggcgcccac catcgctcg 60
cagccctgt cctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacag 120
agggggctgg acttcgcc 138

<210> 16

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CD3-zeta transmembrane domain nucleic acid sequence

<400> 16

[0012]

ctcgatccga agttgtgcta cctgttgac ggcattctct ttatatacgg tgcacctg 60
acagcgttgt ttctccgagt gaag 84

<210> 17

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CD28 intracellular domain nucleic acid sequence

<400> 17

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcgcgcc 60
gggccaccc gcaagcatla ccagccclat gcccaccac ggcactcgc agcclatgc 120
tc 123

<210> 18

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CD3-zeta intracellular domain nucleic acid sequence

<400> 18

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagtc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttitggacaa gagacgtggc 120
cgggaccttg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc cttaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgcc ttacatgca ggccctgcc cctcgctaa 339

<210> 19

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Murine PUCR with Myc-tag nucleic acid sequence

<400> 19

[0013]

gatgtagta tgaccagac gcctctttct ctcccgtcc ggctcggaga ccaagcctcc 60
atctcttccc gaagtcaca atcattgtg cacacgatg gateccata tctgaattgg 120
tatctccaaa agcctggaca gtcccccaag ctgtgatct ataaagtaag taatagattt 180
tccggcgttc ctgaccgtt cagtggctca ggaagcggta cggattttac tcttcggatt 240
tcccgcgtcg aagctgaaga tcttggtgtc tattctgtt cttagggaac gcacctgcca 300
tacacattcg gagggggcac taagctcgaa atcaagggcg ggggcgggtc aggtgtgtgg 360
ggcagcggcg ggggtggcag cgaggtaag ctgttgaaa gtggaggcgg gcttgtcag 420
ccgggcggga ccatgaaact gtctgcgag ataagtggac tcaatttag gaactattgg 480
atgagctggg tgcacagtc ccccagaag ggcctgaat ggggtgccga aatacggtt 540
cgatcagaca actatgcgac gcactacgt gaaagcgtca aaggaaaatt cactatcagc 600
cgggacgaca gcaagagtag actttattg cagatgaata gttgaggac ggaagatacg 660
ggaatatatt attgcaaaac atactctat tcatlital actggggta gggcacgtt 720
gttacgggtt cagecgagca gaagtcatt tccgaagaag atctcgaaa gccgacaac 780
acgccggcac cccggcctcc cccccccc cccactatg ctatcaacc tcttctactg 840
cgccctgaag cgtgtagacc tgcagccggg ggagcagtc atacgcggcg acttgatttc 900
gcccctgacc ccaagttgtg ttacctttg gacgggatcc tcttcattta cgtgtcatt 960
cttactgcct tgtttctcag ggtaaaaagg tctagagat cccgactct cacttctgac 1020
tacatgaata tgacaccgag gagaccggga ccaactcgga agcattatca gccatacgcg 1080
cccccccgag atttcgggc atacaggtca agagtcaagt tctccgcag cgcagacgcg 1140
cccgttacc agcaaggtca aaatcaactc tacaatgagc tcaatctggg acgacgggag 1200

gagtacgatg tectcgacaa gaggagaggt cgggacctg aatgggtgg caaacccag 1260
 cgacgaaga atcctcagga gggctctac aacgagctgc aaaaagataa aatggcggag 1320
 gcgtatagtg aatagggat gaaaggggaa agacgccggg gaaaaggaca tgatggtctg 1380
 tatcagggtc tgtaacagc tactaaagac acatacgaig cgtgcacat gcaagcgttg 1440
 ccgccgagg 1449

<210> 20

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Humanized PUCR with Myc-tag nucleic acid sequence

<400> 20

[0014]

gagcttcaga tgacccaaag tccagctct ctctccgct ctgtcggaga cagggtcacg 60
 ataacctgtc gaagtagcca gagtcttct catacttac gaagccata tcttaactgg 120
 tatcttcaga aaccgggtca atcacccaaag ctgtgatata ataaagtgc taaccggtt 180
 tctggtgtgc cgagtcgatt ttcaggatca gggagcggca cggatttcac tcttacgac 240
 tctagtgtgc aacctgagga tttgtctga tacttttga gccaaagtlac tcatcttct 300
 tatacgttcg gaggggggtac caaagtagaa attaaaggag gaggagggtc cggaggagg 360
 ggcagcggag gaggagggtc agaagtacaa ctctgtgaat ctggcggggg gctgggtgcaa 420
 cctgggggtt ctctccgct gagctgtgt gcatccggct tcacctttc taattattgg 480
 atgagctggg tacggcagtc accggagaaa ggtctggagt ggtgtctga gatacgaatt 540
 agatcagaca actacgcgac gcattacgcc gagagcgtga aaggaagatt taccataagc 600
 agagacaatt caaaaaacac cctgtacct caaalgaata gccacagggc ggaagatact 660
 gggatatatt actgtaaaac ctactttac agttttagt attggggcca gggaacgctt 720
 gtaactgtta gctctgagca gaagtcatt tccgaagaag atctcgcaa gccgacaacg 780
 acgccggcac cccggcctcc cccccgcc ccactatag ctagtcaacc tctttcactg 840
 cgccctgaag cgtgtagacc tgcagccggg ggagcagtc atacgcgcgg acttgatttc 900
 gccctcgacc ccaagtgtg ttacctttg gacgggatcc tcttcattta cgtgtcatt 960
 ctactgcct tgtttctcag ggtaaaaagg tctaagagat cccgactct ccattctgac 1020
 tacatgaata tgacaccgag gagaccggga ccaactcgga agcattatca gccatagcg 1080
 ccccccgcg atttcgcggc atacaggtca agagtcaagt tctccgcag cgcagacgcg 1140
 cccgcttacc agcaaggta aatcaactc tacaatgagc tcaatctggg acgacgggag 1200
 gagtacgatg tectcgacaa gaggagaggt cgggacctg aatgggtgg caaacccag 1260
 cgacgaaga atcctcagga gggctctac aacgagctgc aaaaagataa aatggcggag 1320

gcgtatagtg aaatagggat gaaaggggaa agacgccggg gaaaaggaca tgatggtctg 1380
talcagggtc tgtcaacagc tactaaagac acatacgatg cgctgcacat gcaagcgttg 1440
ccgccgagg 1449

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: linker

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> "Gly Gly Gly Gly Ser" can repeat n amount of times, where n is a positive integer equal to or greater than 1

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

[0015]

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: linker

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: linker

<400> 23
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 24
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> transmembrane domain of human CD28
<400> 24
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25
[0016] <210> 25
<211> 66
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(66)
<223> transmembrane domain of human CD28
<400> 25
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60
Trp Val

65

<210> 26

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> 4-1BB intracellular domain

<400> 26

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> 27

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: 4-1BB intracellular domain nucleic acid sequence

<400> 27

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 28

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CD8 hinge amino acid sequence

<220>

<221> misc_feature

[0017]

<222> (30)..(30)
<223> Xaa can be any amino acid except cysteine
<400> 28
Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
1 5 10 15
Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Xaa Arg Pro
20 25 30
Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
35 40 45
<210> 29
<211> 45
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(45)
<223> CD8 hinge
[0018] <400> 29
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> 30
<211> 135
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: CD8 hinge nucleic acid sequence
<400> 30
accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccategcgtc gcagcccctg 60
tccttcgccc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
gacttcgcct gtgat 135

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Linker

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

<210> 32

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Linker

[0019]

<400> 32

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

35 40 45

<210> 33

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Linker

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60
<210> 34
<211> 75
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Linker
<400> 34
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0020] 35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75
<210> 35
<211> 150
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Linker
<400> 35
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

145 150

<210> 36

<211> 225

[0021]

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Linker

<400> 36

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

[0022] Ser
225

<210> 37

<211> 300

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Linker

<400> 37

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

195 200 205

[0023]

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

260 265 270

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

275 280 285

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

290 295 300

<210> 38

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

[0024]

<223> Synthetic: hydrophobic stretch of the CD3-zeta transmembrane domain sequence

<400> 38

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
1 5 10 15

Thr Ala Leu Phe Leu

20

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Myc-tag nucleic acid sequence

<400> 39

gagcagaagc tgattagcga agaggacctg 30

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Humanized 38C2 variable kappa heavy chain

<400> 40

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(107)

<223> Human kappa light chain constant

<400> 41

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

[0025]

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 42

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Humanized 38C2 variable heavy chain

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0026]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95
Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(108)
<223> Human gamma 1 heavy chain constant domain 1
<400> 43
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
100 105
<210> 44
<211> 505
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Full length humanized 38C2 scFab with signal peptide
<400> 44
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45
[0027] Leu His Thr Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys
100 105 110
Ser Gln Gly Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
275 280 285

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
290 295 300

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro
305 310 315 320

[0028] Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn
325 330 335

Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
340 345 350

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
355 360 365

Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe
370 375 380

Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
385 390 395 400

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
405 410 415

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
420 425 430

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
435 440 445

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
450 455 460

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
465 470 475 480
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
485 490 495
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
500 505
<210> 45
<211> 773
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Full length PUCR comprising 38C2 scFab amino acid
sequence
<400> 45
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
[0029] Val His Ser Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45
Leu His Thr Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys
100 105 110
Ser Gln Gly Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
275 280 285

[0030] Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
290 295 300

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro
305 310 315 320

Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn
325 330 335

Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
340 345 350

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
355 360 365

Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe
370 375 380

Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
385 390 395 400

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
405 410 415

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
420 425 430

[0031]

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
435 440 445

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
450 455 460

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
465 470 475 480

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
485 490 495

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro
500 505 510

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
515 520 525

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
530 535 540

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Pro Arg Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro
545 550 555 560

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
565 570 575

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
580 585 590

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
595 600 605

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
610 615 620

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
625 630 635 640

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
645 650 655

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
660 665 670

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
675 680 685

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
690 695 700

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
705 710 715 720

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
725 730 735

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
740 745 750

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
755 760 765

Ala Leu Pro Pro Arg
770

<210> 46

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Signal peptide nucleic acid sequence

<400> 46

[0032]

atggaatgga gttgggtgtt cttttcttt ctgagtgtca ccaccggagt gcac 54

<210> 47

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: humanized 38C2 scFab nucleic acid sequence

<400> 47

agcgaactgc agatgacceca gtceccatcc agtctgagcg ctagegttgg tgacagagtt 60

actatcacct gccgctcttc acagagcctg ttgcacactt acggtcttcc ttacctgaac 120

tggtatcttc agaagccctgg ccaaagccct aagctgtcctc tctacaaggt gtctaacagg 180

ttctccgggg ttccgtcccg ctttcaggg agcgggtcag gaacagactt caccttgaca 240

atctcaagcc tccagcccga ggattttgcc gtctatttct gctcacaagg cacacatctg 300

ccgtatacct ttggggggcg gacaaaagtc gagatcaaaa ggaccgtcgc tgcaccatcc 360

gtgtttatct tcccaccaag tgacgaacag ctcaagagcg gtactgcctc cgttgtttgt 420

ctgtgaaca acttctatcc aagggaagca aaggtgcaat ggaaagtaga caacgtctctg 480

cagtcaggca actcccagga gtcagtgacc gagcaggata gcaaagattc aacatacagc 540

ctgagcagca cctcaccct gagtaaggcc gattacgaga agcacaaggt ttacgcctgc 600
 gaggigaccc accagggcct tcatcccca gtcaccaaatt ctfttaaccg cggcgaatgc 660
 gggggaggct ctggtggagg cggttctgga gggggctcag gaggaggcgg tagcggcggt 720
 ggtagtgggg gtggcggatc tggcggaggt ggctcaggag gaggtagcgg cggcgggggc 780
 agcgaggtec agctggtaga gtcagggtga ggattggtgc agcccggcgg cagtcttaga 840
 ctacgtgtg cggccagcgg atttacttct tcaaattatt ggaatgtctg ggtcaggcag 900
 agcccagaga aaggcctgga atgggtgta gagatccgac tgagaagcga taattacgcg 960
 actcattatg cggaaagcgt taaaggctgg ttactattt cagagataa ttctaagaat 1020
 accctttatc tgcagatgaa cagcttgcgc gccgaggaca caggcatcta ctactgtaaa 1080
 acttacttct attcttttct ctactgggga caggggactc tegtacagt cagtagcgcc 1140
 tccaccaagg gtcttagtgt ctftccctg gcccctcat ccaagtccac gtcaggaggc 1200
 accggggctc tgggtgtct ggtaaaagac tactttctg agccagtcac cgtgtcttgg 1260
 aattccggcg cgcttacttc tggcgtgcac actttcccg ccgtcttcca gagcagtggt 1320
 ctgtattccc tgtcttcctg agtcaactgt ccaagctcca gtctgggaac ccagacctat 1380
 atttgaatg tgaatcataa gccgagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggaaccgaag 1440
 tcatgtgaca aaaccacac t 1461

[0033]

<210> 48

<211> 2322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Full length PUCR comprising 38C2 scFab nucleic acid sequence

<400> 48

atggaatgga gttgggtgtt ccttttctt ctgagtgtca ccaccggagt gcacagcgaa 60
 ctgcagatga cccagtcctc atccagtctg agcgctagcg ttggtgacag agttactatc 120
 acctgcccgt cttcacagag cctgttgca acttacggct ctctttacct gaactgggat 180
 cttcagaage ctggccaaag ccctaagctg ctcatctaca aggtgtctaa caggttctcc 240
 ggggttccgt cccgctttc agggagcggg tcaggaacag acttcacct gacaatctca 300
 agcctccagc ccgaggattt tgccgtctat ttctgtcac aaggcacaca tetgcccgtat 360
 acctttgggg gcgggacaaa agtcgagatc aaaaggaccg tegtgcacc atccgtgttt 420
 atcttccac caagtacga acagctcaag agcggtagct cctccgttgt ttgtctgtg 480
 aacaacttct atccaaggga agcaaagggt caatggaaag tagacaacgc tctgcagtca 540
 ggcaactccc aggagtcagt gaccgagcag gatagcaaag attcaacata cagcctgagc 600

agcaccctca ccctgagtaa ggccgattac gagaagcaca aggtttacgc ctgcgaggtg 660
accaccagg gcctttcacc cccagtcacc aaatcttta accgcggcga atgcggggga 720
ggctctggtg gagggcgttc tggagggggc tcaggaggag gcggtagcgg cggtggtagt 780
gggggtggcg gatctggcgg aggtggctca ggaggaggta gcggcggcgg gggcagcgag 840
gtccagctgg tagagtcagg tggaggattg gtgcagcccg gcggcagctct tagactcagc 900
tgtgcggcca gcggatttac ttctcaaat tattggatgt cttgggtcag gcagagccca 960
gagaaaggcc tggaatgggt gtcagagatc cgaactgagaa gcgataatta cgcgactcat 1020
tatgcggaaa gcgttaaagg tcggttcact atttcacgag ataattctaa gaalaccctt 1080
tatctgcaga tgaacagctt gcgcgccgag gacacaggca tctactactg taaaacttac 1140
ttctattctt ttctactg gggacagggg actctcgta cagtcagtag cgctccacc 1200
aagggtccta gtgtcttcc cctggccccc tcaccaagt ccaagtcagg aggcaccgag 1260
gctctgggtc gtctggctaa agactacttt cctgagccag tcaccgtgc ctggaattcc 1320
ggcgcgctta cttctggcgt gcacacttc cccgccgtcc tccagagcag tgggctgtat 1380
tccctgtctt ccgtagtcac tgtgccaagc tccagtctgg gaaccagac ctatatttgt 1440
aatgtgaate ataagccgag caacaccaag gtggacaaga aggtggaacc gaagtcagt 1500
gacaaaacce aactgctaa gccaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 1560
[0034] cccaccatcg cgtgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 1620
ggcgcagtcg acacgagggg gctggacttc gccctagga aaattgaagt tatgtatct 1680
cctccttacc tagacaatga gaagagcaat ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac 1740
ctttgtccaa gtccctatt tccggacct tctaagccct ttgggtgtct ggtggtggtt 1800
ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta glaacagtgg cctttattat ttctgggtg 1860
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcccccc 1920
ggcccccacc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 1980
tccagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag 2040
ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtagc atgttttga caagagacgt 2100
ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 2160
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 2220
cgccggaggg gcaaggggca cgaaggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 2280
acctagcagc ccttcacat gcaggccctg cccctcgt aa 2322
<210> 49
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Synthetic: Anti-PSMA Clone A11 Heavy Chain Variable Domain

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Trp Asp Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Asp Ala Phe Asp

100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

[0035]

115 120

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Anti-PSMA Clone A11 Light Chain Variable Domain

<400> 50

Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105
<210> 51
<211> 380
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(380)
<223> IL13R amino acid sequence
<400> 51
Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile
1 5 10 15
[0036] Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val
20 25 30
Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr
35 40 45
Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu
50 55 60
Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr
65 70 75 80
Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp
85 90 95
Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln
100 105 110
Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr
115 120 125
Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp
130 135 140
Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly
145 150 155 160

Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu
165 170 175
Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly
180 185 190
Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys
195 200 205
Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg
210 215 220
Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro
225 230 235 240
Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu
245 250 255
Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr
260 265 270
Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val
275 280 285
Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu
[0037] 290 295 300
Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly
305 310 315 320
Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu
325 330 335
Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu
340 345 350
Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr
355 360 365
Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr
370 375 380
<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Anti-VEGFR2 VK-B8 Light Chain Variable Domain

<400> 52

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Asn

20 25 30

Leu Gly Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 53

<211> 126

[0038]

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Anti-VEGFR2 VK-B8 Heavy Chain Variable Domain

<400> 53

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

1 5 10 15

Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Phe Gly

20 25 30

Ser Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Arg Leu Ile Pro Ile Phe Gly Thr Arg Asp Tyr Ala Gln

50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 54

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: PolyGlySer linker

<400> 54

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

35 40

[0039]

<210> 55

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Hybrid CD8 and CD28 hinge amino acid sequence

<400> 55

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Pro Arg
35 40 45

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
50 55 60

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
65 70 75 80

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

85

<210> 56

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CD8 portion of hybrid CD8 and CD28 hinge amino acid
sequence

<400> 56

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro

1 5 10 15

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro

20 25 30

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala

35 40 45

[0040]

<210> 57

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Hinge linker amino acid sequence

<400> 57

Pro Arg

1

<210> 58

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CD28 portion of hybrid CD8 and CD28 hinge amino acid
sequence

<400> 58

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

1 5 10 15
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
20 25 30
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
35 40
<210> 59
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: CD3-zeta intracellular domain amino acid sequence
<400> 59
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln 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
[0041] 35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110
<210> 60
<211> 264
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Hybrid CD8 and CD28 hinge nucleic acid sequence
<400> 60
gctaagccca ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaaacac cgcgccccac catcgcgtcg 60

cagccccctgt cctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 120
agggggctgg acttcgcccc taggaaaatt gaagtatgt atcctctcc ttacctagac 180
aatgagaaga gcaatggaac cattatccat gtgaaaggga aacacctttg tccaagtccc 240
ctatttcccg gaccttetaa gccc 264

<210> 61

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CD28 transmembrane domain nucleic acid sequence

<400> 61

tttgggtgc tgggtgggt tggggagtc ctggcttgc atagcttgc agtaacagtg 60
gcctttatta tttctgggt g 81

<210> 62

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0042]

<220>

<223> Synthetic: CD3 intracellular domain nucleic acid sequence

<400> 62

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcglacc agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg tttggacaa gagacgtggc 120
cgggacctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgcc ttacatgca ggccttccc cctcgttaa 339

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Myc-tag nucleic acid sequence

<400> 63

gagcagaage tgattagcga agaggacctg 30

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(14)

<223> Cyclic

<400> 64

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys

1 5 10

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

[0043]

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(7)

<223> Cyclic

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> D-amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Thr(ol)
<400> 65
Phe Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
1 5
<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-amino acid
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(7)
[0044] <223> Cyclic
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-amino acid
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Thr(ol)
<400> 66
Phe Cys Tyr Trp Lys Thr Cys Thr
1 5
<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Synthetic peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-amino acid
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(7)
<223> Cyclic
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-amino acid
<400> 67
Phe Cys Tyr Trp Lys Thr Cys Thr
1 5
[0045] <210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-amino acid
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(7)
<223> Cyclic
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 1-Nal

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-amino acid
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Thr(ol)
<400> 68
Phe Cys Ala Trp Lys Thr Cys Thr
1 5
<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
[0046] <223> Synthetic peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-amino acid
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(7)
<223> Cyclic
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 1-Nal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-amino acid
<400> 69

Phe Cys Ala Trp Lys Thr Cys Thr

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(7)

<223> Cyclic

<220>

[0047]

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> BzThi

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> D-amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Thr(ol)

<400> 70

Phe Cys Xaa Trp Lys Thr Cys Thr

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-amino acid
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(7)
<223> Cyclic
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> BzThi
<220>
[0048] <221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-amino acid
<400> 71
Phe Cys Xaa Trp Lys Thr Cys Thr
1 5
<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> DAB
<220>
<221> misc_feature

<222> (2)..(9)
<223> Cyclic
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-amino acid
<400> 72
Tyr Xaa Arg Phe Phe Trp Lys Thr Phe
1 5
<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
[0049] <221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> p-Cl-Phe
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-amino acid
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(7)
<223> Cyclic
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Aph(Cbm)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> D-amino acid

<400> 73

Phe Cys Tyr Xaa Lys Thr Cys Tyr

1 5

<210> 74

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> misc_feature

<223> C-term NH2

<220>

[0050]

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pGlu

<400> 74

Glu Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met

1 5 10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> misc_feature

<223> C-term NH2

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
<223> N,N-dimethyl-Gly
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> N3S
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Cys(acm)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ava
<400> 75
Gly Ser Cys Gly Xaa Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met
1 5 10
[0051]
<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term N40-1-bzlg0
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NHEt13
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-amino acid
<400> 76

Phe Gln Trp Ala Val Gly His Leu

1 5

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> misc_feature

<223> N-term N4

<220>

<221> misc_feature

<223> C-term NH2

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

[0052]

<223> Nle

<400> 77

Pro Gln Arg Tyr Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His Leu Leu

1 5 10

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> misc_feature

<223> C-term NH2

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> (N-alphaHis)Ac

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(3)
<223> Beta-Ala
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Cha
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle
<400> 78
His Ala Ala Gln Trp Ala Val Gly His Ala Leu
1 5 10
<210> 79
<211> 11
[0053] <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term 3-cyano-4-trimethylammonium-benzoyl
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(2)
<223> Ala(SO3H)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)

<223> Ava
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> NMeGly
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Sta
<400> 79
Ala Ala Xaa Gln Trp Ala Val Gly His Xaa Leu
1 5 10
<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
[0054] <223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<400> 80
Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe
1 5 10
<210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<400> 81

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe

1 5 10

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> misc_feature

<223> C-term NH2

<220>

[0055]

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-amino acid

<400> 82

Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe

1 5

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> misc_feature

<223> C-term NH2

<400> 83

His His Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe

1 5 10

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Nle
<400> 84

His His Glu Ala Tyr Gly Trp Leu Asp Phe
1 5 10

[0056]

<210> 85
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term N4
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-amino acid
<400> 85

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe

1 5 10
<210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> gamma-D-Glu
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
[0057] <223> Cyclic
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-amino acid
<400> 86
Glu Ala Tyr Lys Trp Met Asp Phe
1 5
<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2

<220>
<221> misc_feature
<223> see specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Cys modified with a unique side chain
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Nle
<400> 87
Gly Ser Cys Glu Ala Tyr Gly Trp Leu Asp Phe
1 5 10
<210> 88
[0058] <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NHC2H5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pGlu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Ser(tBu)
<400> 88
Glu His Trp Ser Tyr Ser Leu Arg Pro

1 5
<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pGlu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
[0059] <223> D-Ser(tBu)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> AzGly
<400> 89
Glu His Trp Ser Tyr Ser Leu Arg Pro Gly
1 5 10
<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NHC2H5

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pGlu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-amino acid
<400> 90
Glu His Trp Ser Tyr Leu Leu Arg Pro
1 5
<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
[0060] <223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NHC2H5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pGlu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Nal(2)
<400> 91
Glu His Trp Ser Tyr Ala Leu Arg Pro
1 5
<210> 92
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pGlu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-amino acid
<400> 92
Glu His Trp Ser Tyr Trp Leu Arg Pro Gly
1 5 10
[0061]
<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term Ac
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-amino acid
<220>

<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Cpa
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-amino acid
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-amino acid
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> I-Lys
<220>
[0062] <221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-amino acid
<400> 93
Ala Xaa Ala Ser Tyr Asp Leu Lys Pro Ala
1 5 10
<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term Ac
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Nal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Cpa
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Pal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Aph(Ac)
[0063] <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Aph(Ac)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> I-Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-amino acid
<400> 94
Ala Xaa Xaa Ser Phe Phe Leu Lys Pro Ala
1 5 10
<210> 95
<211> 10
<212> PRT

[0064]

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term Ac
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Nal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Cpa
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Pal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Hci
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> I-Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-amino acid
<400> 95

[0065]

Ala Xaa Xaa Ser Tyr Xaa Leu Lys Pro Ala

1 5 10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> misc_feature

<223> N-term Ac

<220>

<221> misc_feature

<223> C-term NH2

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> D-Cpa

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> D-Pal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Lys(Nic)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> D-Lys(Nic)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> I-Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-amino acid
<400> 96
Ala Xaa Xaa Ser Lys Lys Leu Lys Pro Ala
1 5 10
<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
[0066] <223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term Ac
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Nal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Cpa
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)

<223> D-Pal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Aph(Atz)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Aph(Atz)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> I-Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-amino acid
[0067] <400> 97
Ala Xaa Xaa Scr Phe Phe Leu Lys Pro Ala
1 5 10
<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term Ac
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
<223> D-Nal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Cpa
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Pal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Cit
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
[0068] <223> D-amino acid
<400> 98
Ala Xaa Xaa Ser Tyr Xaa Leu Arg Pro Ala
1 5 10
<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term Ac
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>

<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Nal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Cpa
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Pal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Aph(L-hydroorotyl)
<220>
[0069] <221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-Aph(carbamoyl)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> I-Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-amino acid
<400> 99
Ala Xaa Xaa Ser Phe Phe Leu Lys Pro Ala
1 5 10
<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term Ac
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Nal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Cpa
<220>
[0070] <221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Pal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-hArg(Et2)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> hArg(Et2)
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-amino acid
<400> 100
Ala Xaa Xaa Ser Tyr Arg Leu Arg Pro Ala

1 5 10
<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide
<220>
<221> misc_feature
<223> N-term Ac
<220>
<221> misc_feature
<223> C-term NH2
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Nal
[0071] <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Cpa
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Pal
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> N-MeTyr
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> D-hCit
<220>

<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Nle
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-amino acid
<400> 101
Ala Xaa Xaa Ser Tyr Xaa Leu Arg Pro Ala
1 5 10
<210> 102
<211> 483
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Murine PUCR with Myc-tag without signal peptide amino
acid sequence
[0072] <400> 102
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
20 25 30
Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
85 90 95
Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
115 120 125

[0073]

Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Thr
130 135 140

Met Lys Leu Ser Cys Glu Ile Ser Gly Leu Thr Phe Arg Asn Tyr Trp
145 150 155 160

Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
165 170 175

Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
180 185 190

Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg Leu
195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr
210 215 220

Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala
245 250 255

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
260 265 270

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
275 280 285

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Leu Asp Pro
290 295 300

Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile
305 310 315 320

Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
325 330 335

Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
340 345 350

Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
355 360 365

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
370 375 380

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
385 390 395 400

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
405 410 415

Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
420 425 430

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
435 440 445

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
450 455 460

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
465 470 475 480

Pro Pro Arg
<210> 103
<211> 483
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
[0074] <223> Synthetic: Humanized PUCR with Myc-tag without signal peptide
amino acid sequence
<400> 103

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

115 120 125
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
130 135 140
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp
145 150 155 160
Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
165 170 175
Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
180 185 190
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
195 200 205
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr
210 215 220
Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala
245 250 255
[0075] Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
260 265 270
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
275 280 285
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Leu Asp Pro
290 295 300
Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile
305 310 315 320
Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
325 330 335
Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
340 345 350
Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
355 360 365
Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
370 375 380
Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu

385 390 395 400

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly

405 410 415

Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu

420 425 430

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

435 440 445

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu

450 455 460

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu

465 470 475 480

Pro Pro Arg

<210> 104

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

[0076]

<223> Synthetic: Full length humanized 38C2 scFab without signal
peptide amino acid sequence

<400> 104

Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr

20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly

85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly
210 215 220
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240
[0077] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
260 265 270
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
275 280 285
Phe Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly
290 295 300
Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr
305 310 315 320
His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
325 330 335
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
340 345 350
Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp
355 360 365
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
370 375 380

[0078]

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
385 390 395 400

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
405 410 415

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
420 425 430

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
435 440 445

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
450 455 460

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
465 470 475 480

Cys Asp Lys Thr His Thr
485

<210> 105

<211> 754

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Full length PUCR comprising 38C2 scFab without signal
peptide amino acid sequence

<400> 105

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr
20 25 30

Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
85 90 95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly
210 215 220

[0079] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
260 265 270

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
275 280 285

Phe Ser Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr
305 310 315 320

His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
325 330 335

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
340 345 350

Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp
355 360 365

[0080]

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
370 375 380

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
385 390 395 400

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
405 410 415

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
420 425 430

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
435 440 445

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
450 455 460

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
465 470 475 480

Cys Asp Lys Thr His Thr Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
485 490 495

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
500 505 510

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
515 520 525

Leu Asp Phe Ala Pro Arg Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
530 535 540

Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
545 550 555 560

His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
565 570 575

Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
580 585 590

Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
595 600 605

Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
610 615 620

Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
625 630 635 640

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 645 650 655
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 660 665 670
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 675 680 685
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 690 695 700
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 705 710 715 720
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 725 730 735
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 740 745 750
 Pro Arg

<210> 106

<211> 2268

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Full length PUCR comprising 38C2 scFab without signal
 peptide nucleic acid sequence

<400> 106

agcgaactgc agatgacceca gtecccatcc agtctgagcg ctagecgttg tgacagagtt 60
 actataacct gcegetcttc acagagcctg ttgcacactt acggetctcc ttacctgaac 120
 tggatatctc agaagcctgg ccaaagecct aagctgctca tctacaaggt gtetaacagg 180
 ttctccgggg ttccgtcccg ctttcaggg agcgggtcag gaacagactt caccttgaca 240
 atctcaagcc tccageccga ggattttgcc gtctatttct gctcacaagg cacacatctg 300
 ccgtatacct ttggggggcg gacaaaagtc gagatcaaaa ggaccgtcgc tgcacatcc 360
 gtgtttatct tcccaccaag tgacgaacag ctcaagagcg gtactgcctc cgttgtttgt 420
 ctgctgaaca acttctatcc aagggaagca aagggtgcaat ggaaagtaga caacgctctg 480
 cagtcaggca actcccagga gtcagtgacc gaggcaggata gcaaagattc aacatacagc 540
 ctgagcagca cctcaccct gagtaaggcc gattacgaga agcacaaggt ttacgcctgc 600
 gaggtgaccc accagggcct tcatcccga gtcaccaaatt ctttaaccg cggcgaatgc 660

[0081]

gggggaggct ctgggtggagg cgggtctgga gggggctcag gaggaggcgg tagcggcggt 720
ggtagtgggg gtggcggatc tggcggaggt ggctcaggag gaggtagcgg cggcgggggc 780
agcgaggtec agctggtaga gtcagggtga ggattggtgc agcccggcgg cagtcttaga 840
ctcagctgtg cggccagcgg atttactttc tcaaattatt ggatgtcttg ggtcaggcag 900
agcccagaga aaggcctgga atgggtgtca gagatccgac tgagaagcga taattacgcg 960
actcattatg cggaaagcgt taaaggcgg ttcactattt cagagataa ttctaagaat 1020
acctttatc tgcagatgaa cagcttgcgc gccgaggaca caggcatcta ctactgtaaa 1080
acttacttct attcttttc ctactgggga caggggactc tcgttacagt cagtagegcc 1140
tccaccaagg gtcttagtgt ctctccctg gcccctcat ccaagtcac gtcaggaggc 1200
accgcggtc tgggtgtct ggtcaaagac tactttctg agccagtcac cgtgtcctgg 1260
aattccggcg cgttacttc tggcgtgcac actttcccg cgtctctca gagcagtggg 1320
ctgtattccc tgtctccgt agtcactgtg ccaagctcca gtctgggaac ccagacctat 1380
atttgaatg tgaatcataa gccgagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggaaccgaag 1440
[0082] tcatgtgaca aaaccacac tgetaagccc accacgacgc cagcgcccg accaccaaca 1500
cgggcgcca ccacgcgtc gcagcccctg tcctgcgcc cagaggcgtg cggccagcg 1560
ggggggggcg cagtgcacac gggggggctg gacttcgcc ctaggaaaat tgaagttagt 1620
tatctctc cttacctaga caatgagaag agcaatggaa ccattatcca tgtgaaagg 1680
aaacacctt gtccaagtc cctattccc ggaccttcta agccctttg ggtgctgggt 1740
gtggttggtg gactctggc ttgctatagc ttgctagtaa cagtggcctt tattatttc 1800
tgggtgagga gtaagaggag caggctctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc 1860
cgccccgggc ccaccgcaa gcattaccag cctatgcc caccacgga ctctgcagcc 1920
tatcgtcca gagtgaagt cagcaggagc gcagacgcc ccgcgtacca gcaggccag 1980
aaccagctct ataacagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt ttggacaag 2040
agacgtggcc gggacctga gatgggggga aagccagaa ggaagaacce tcaggaaggc 2100
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtगतat tgggatgaaa 2160
ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggctttacc aggtctcag tacagccacc 2220
aaggacacct acgacgcct tcatatcag gccctgccc ctgctaa 2268

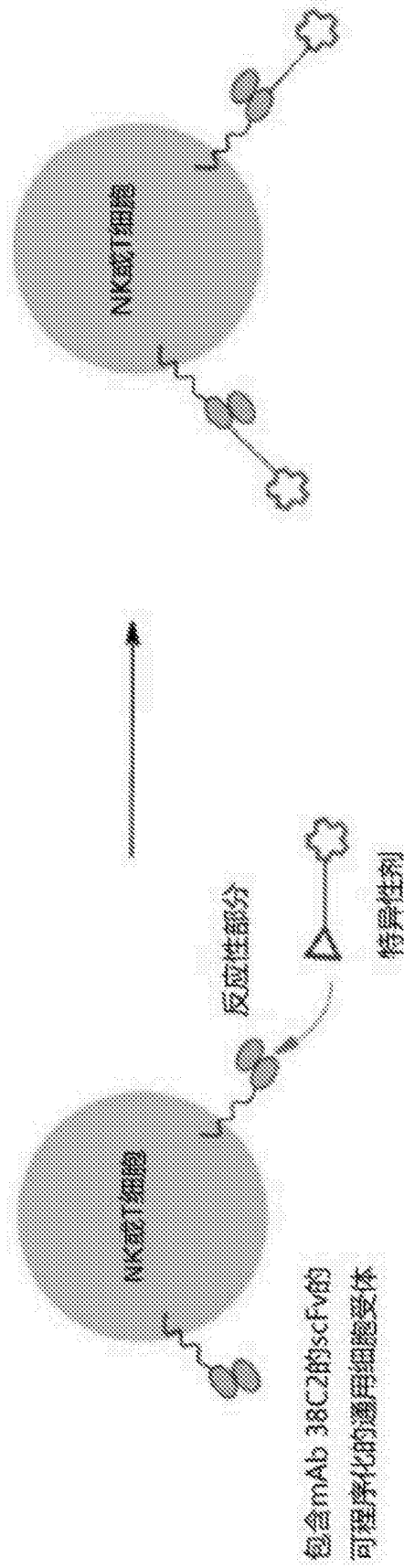


图1

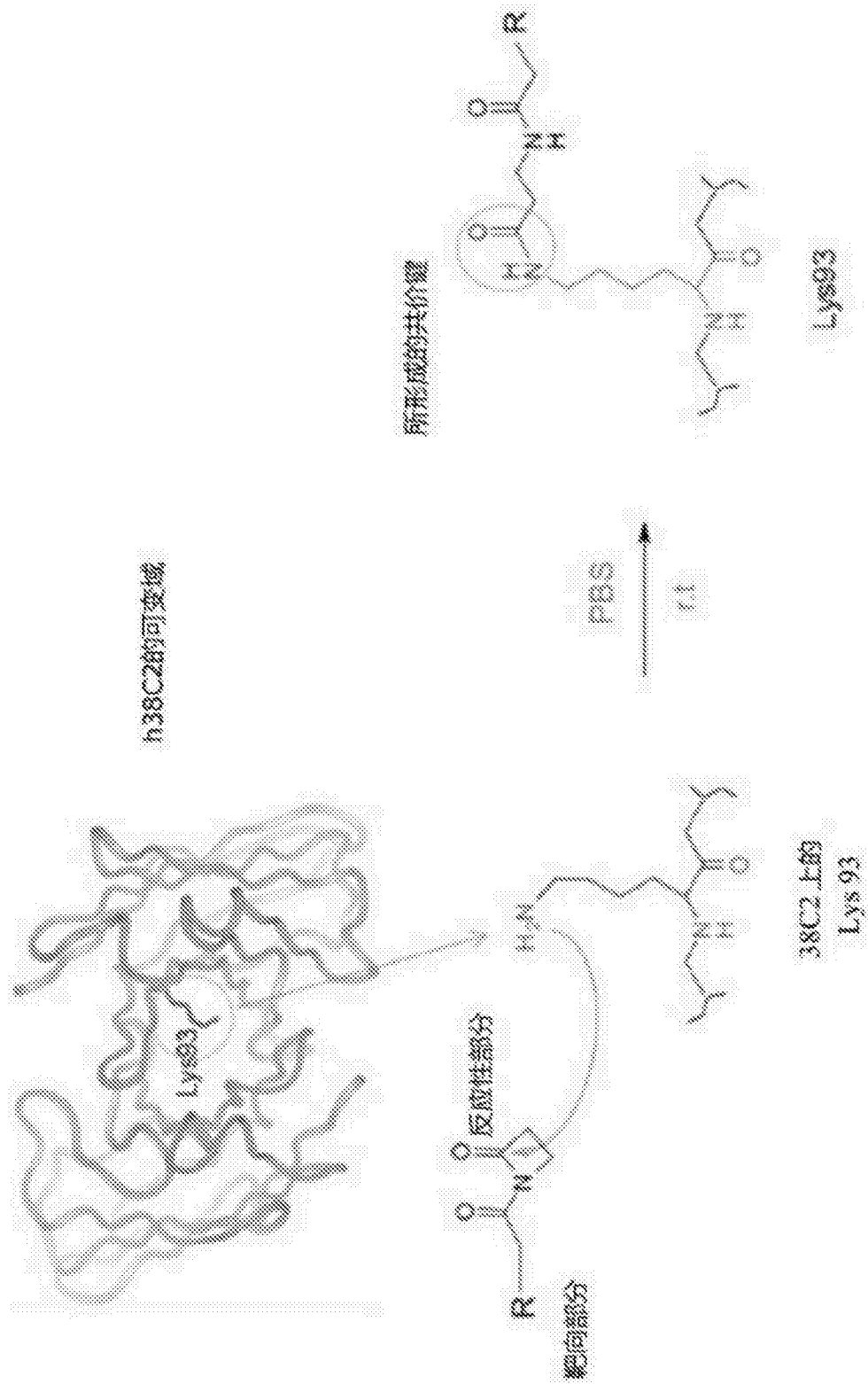


图2

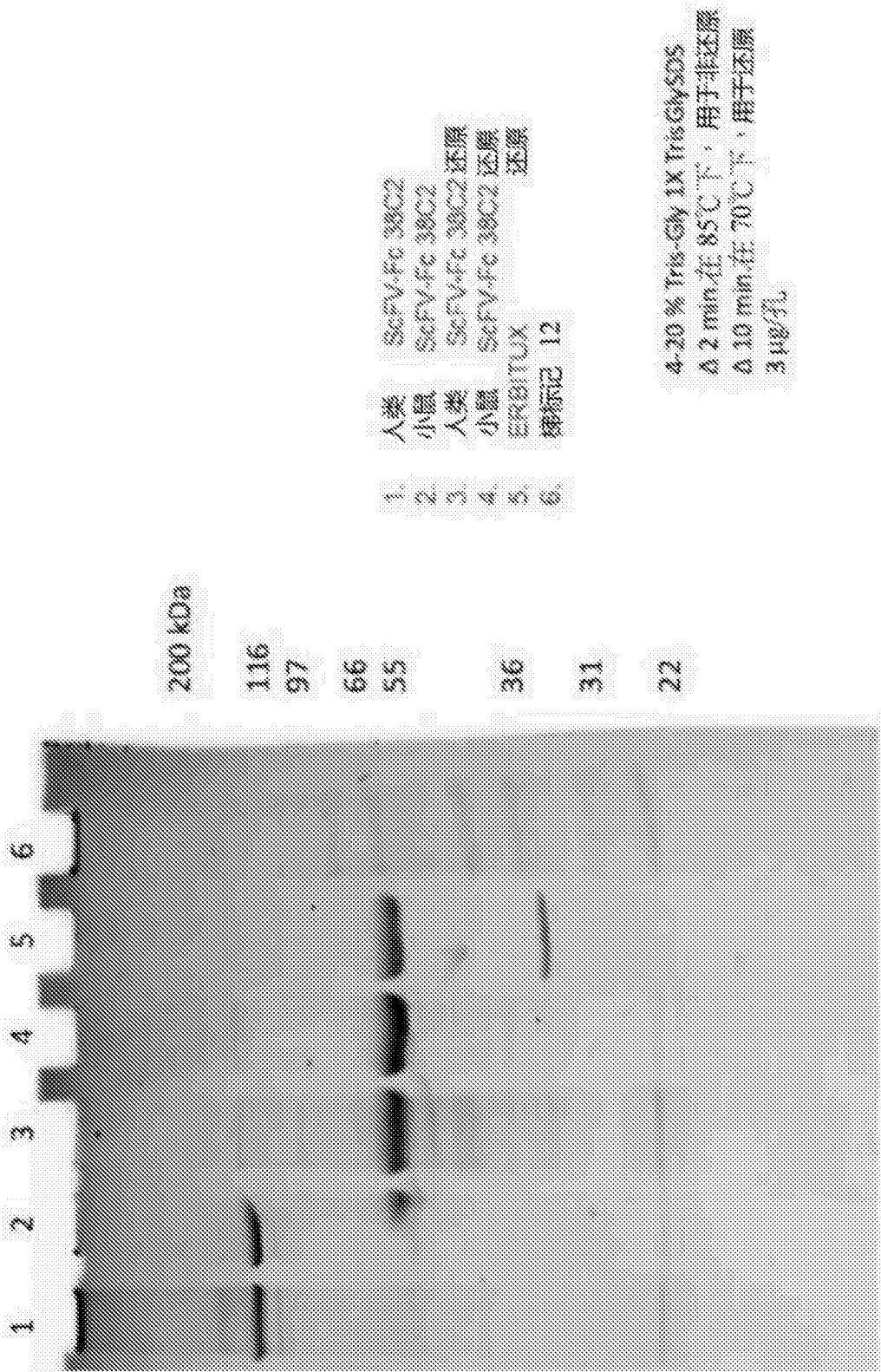


图3

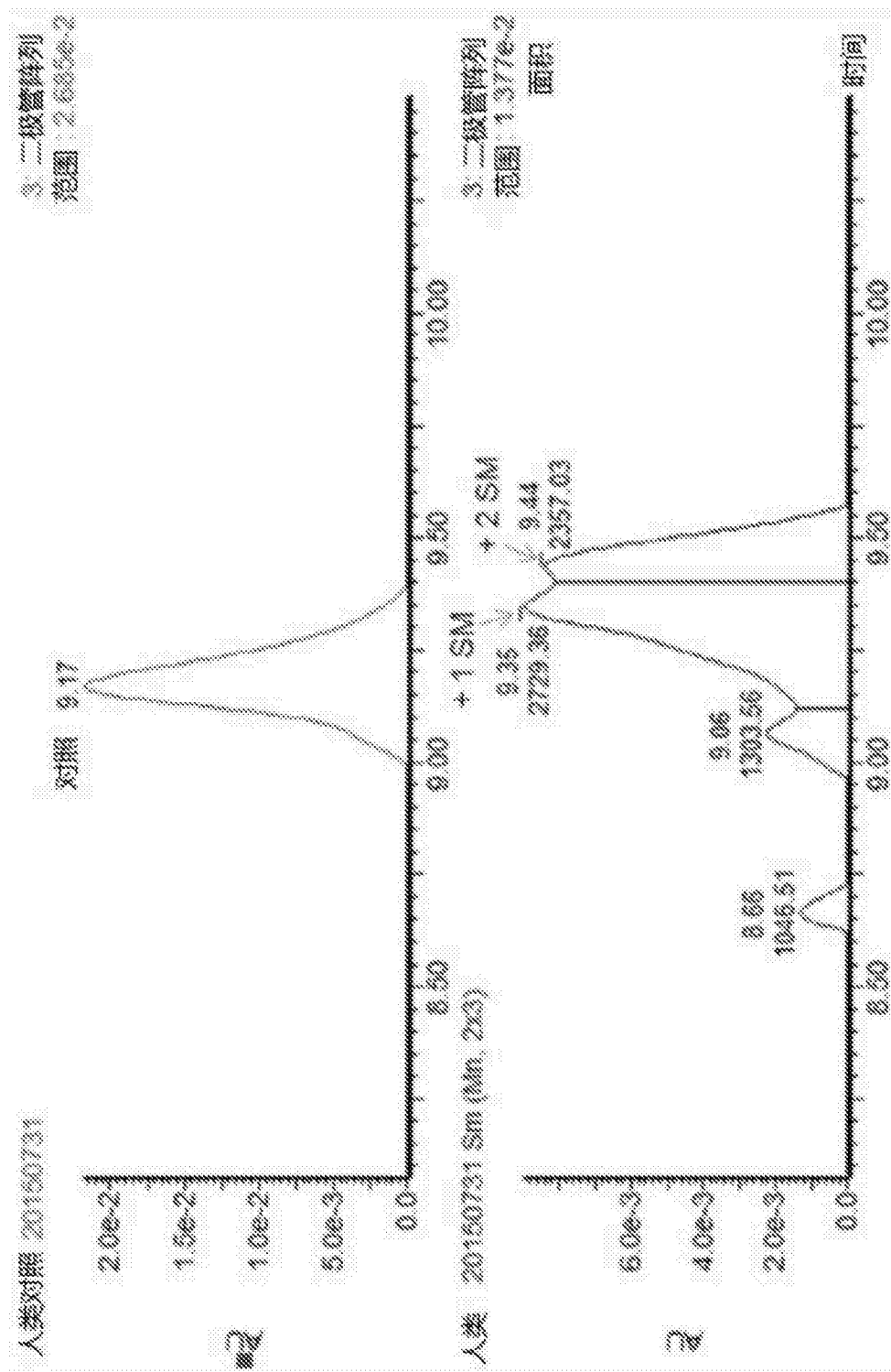


图4

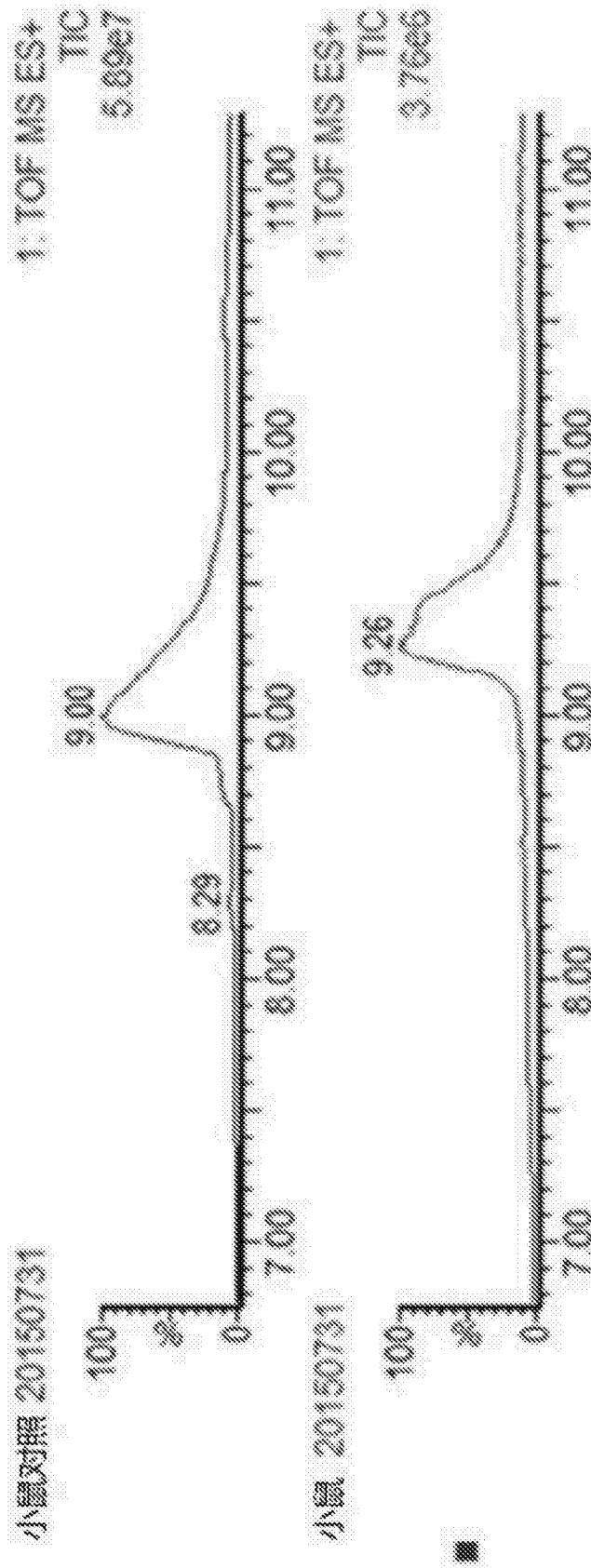


图5

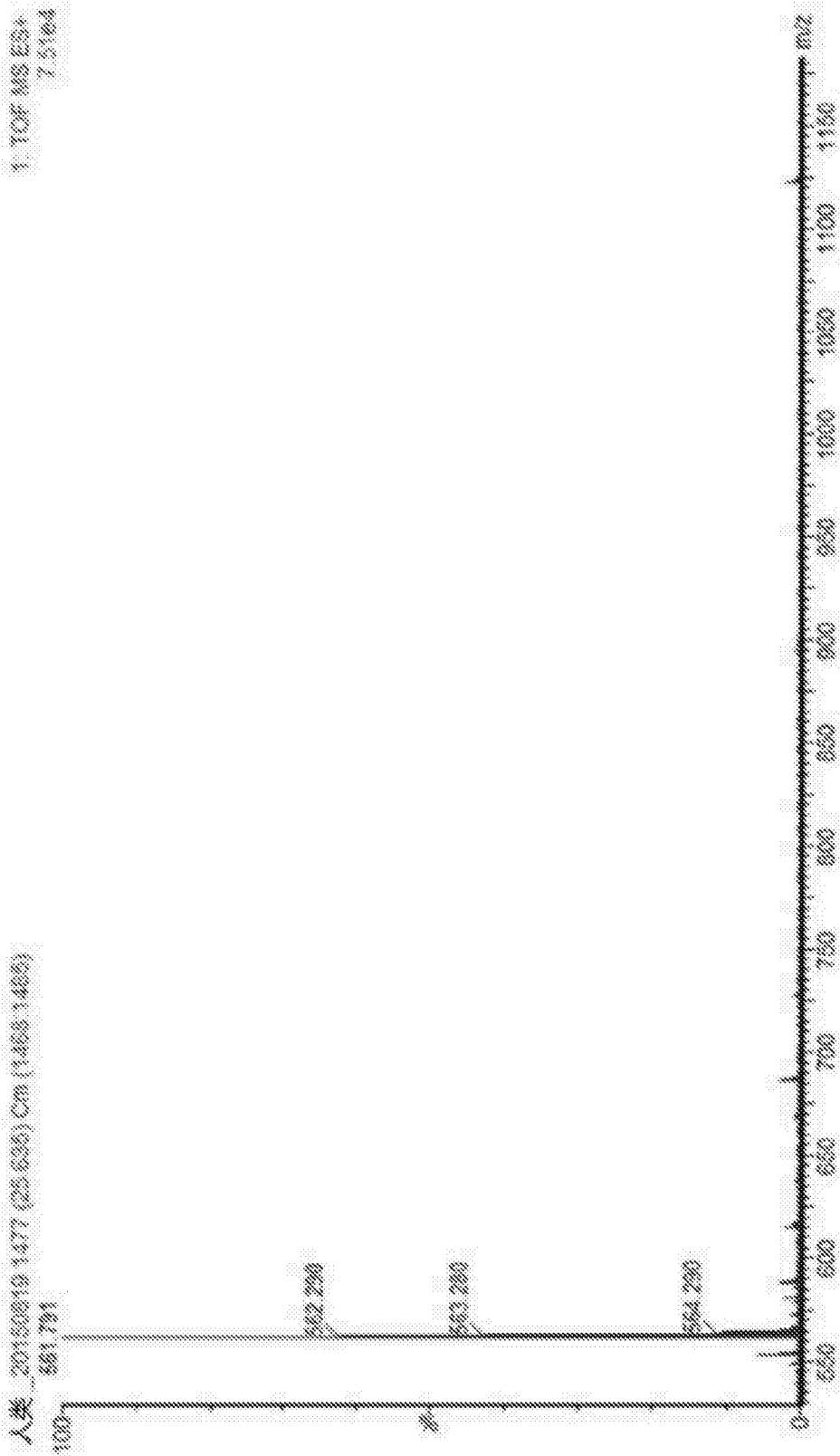


图6

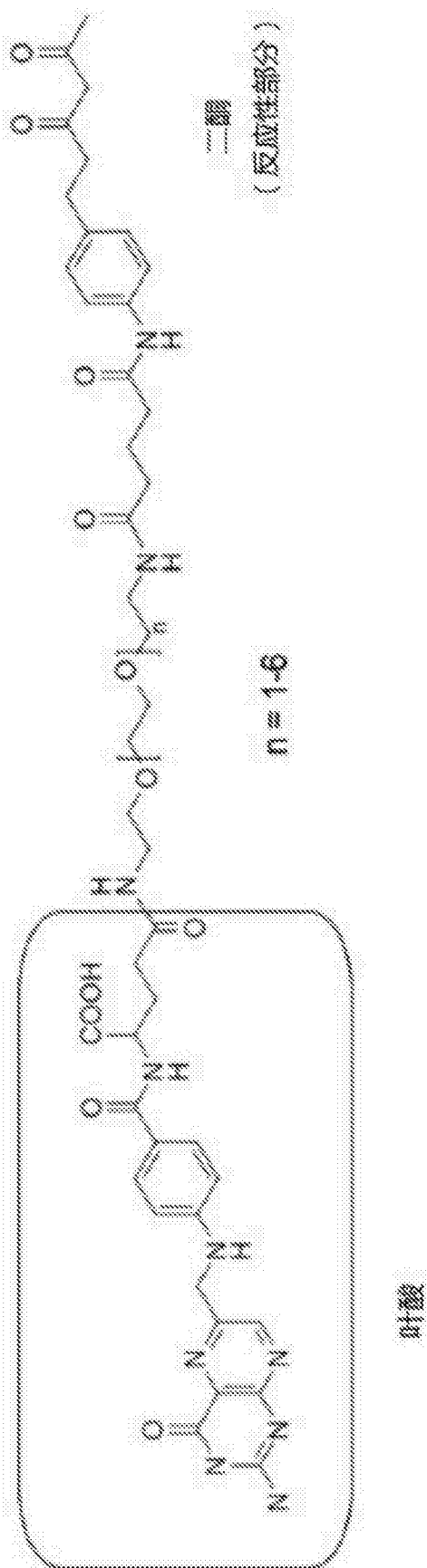


图7

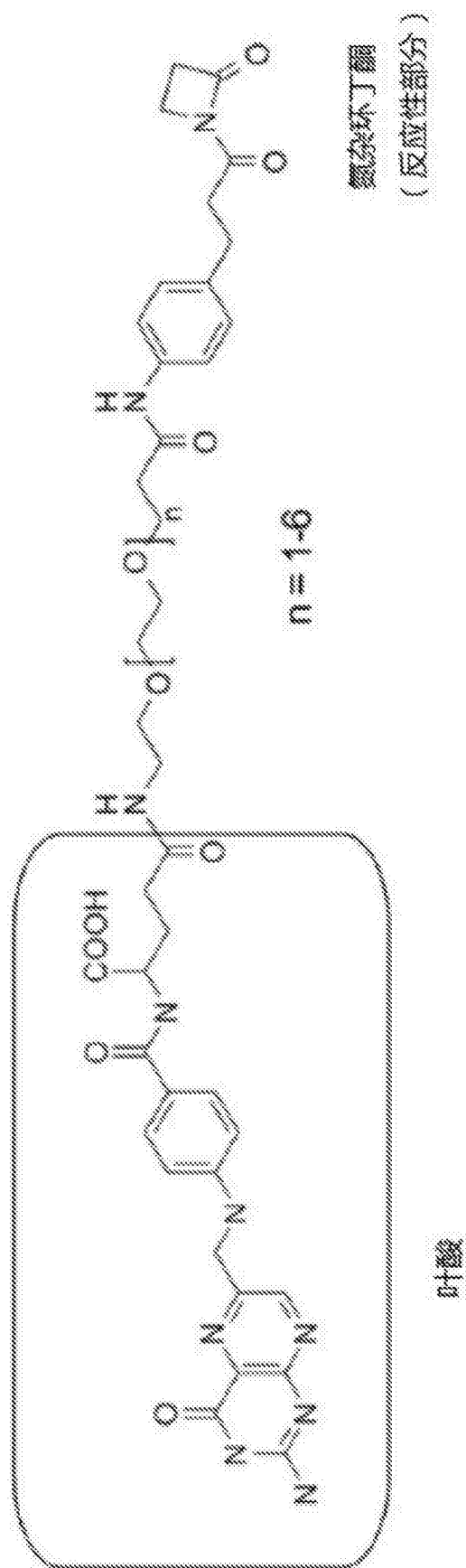


图8

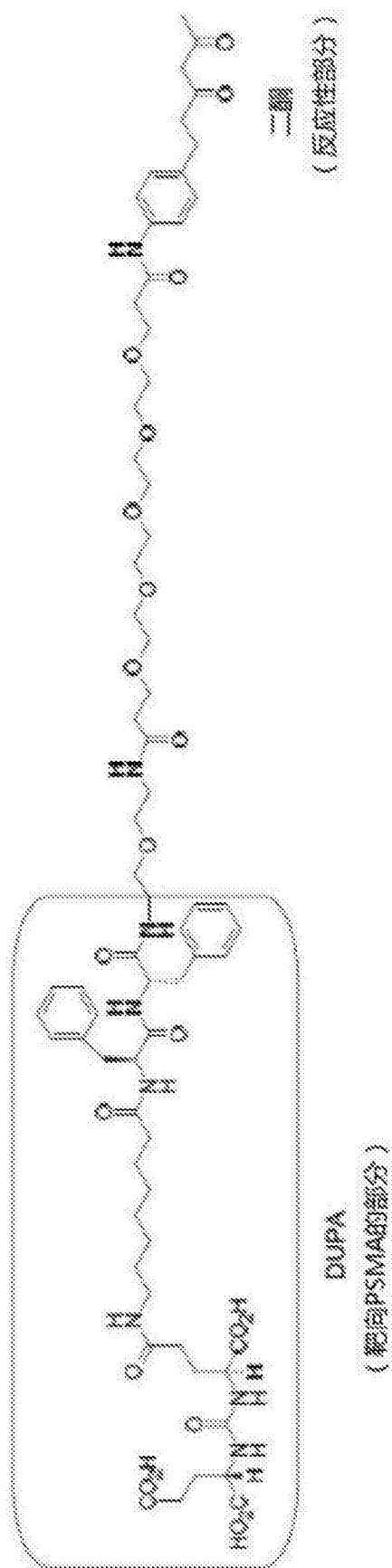


图9

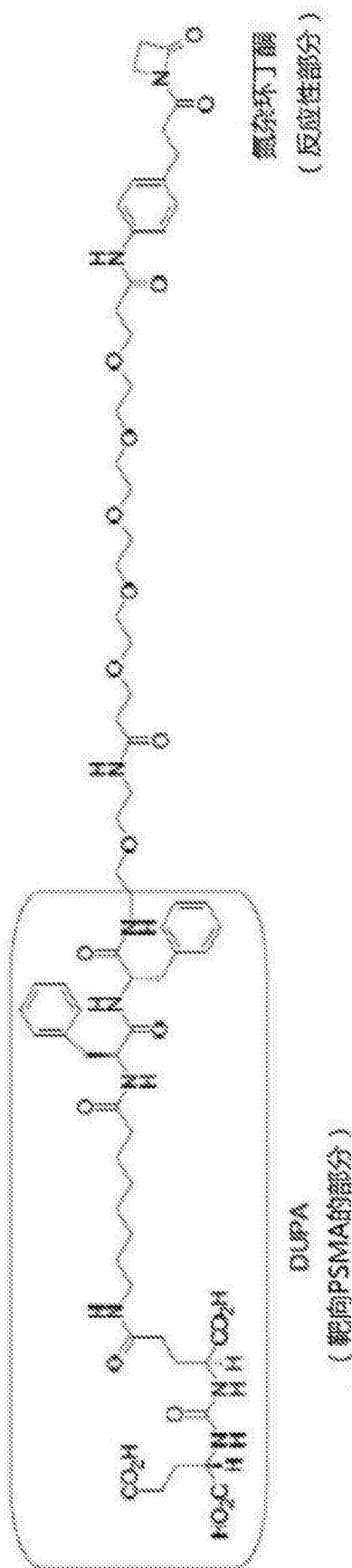


图10

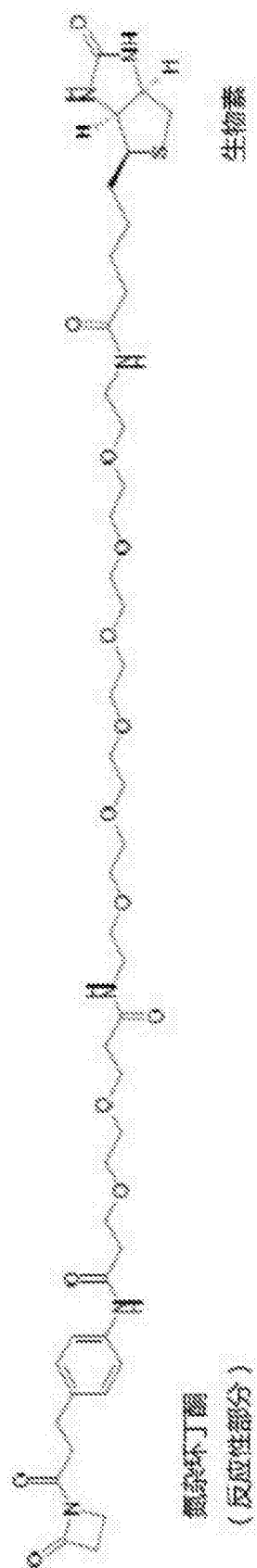


图11

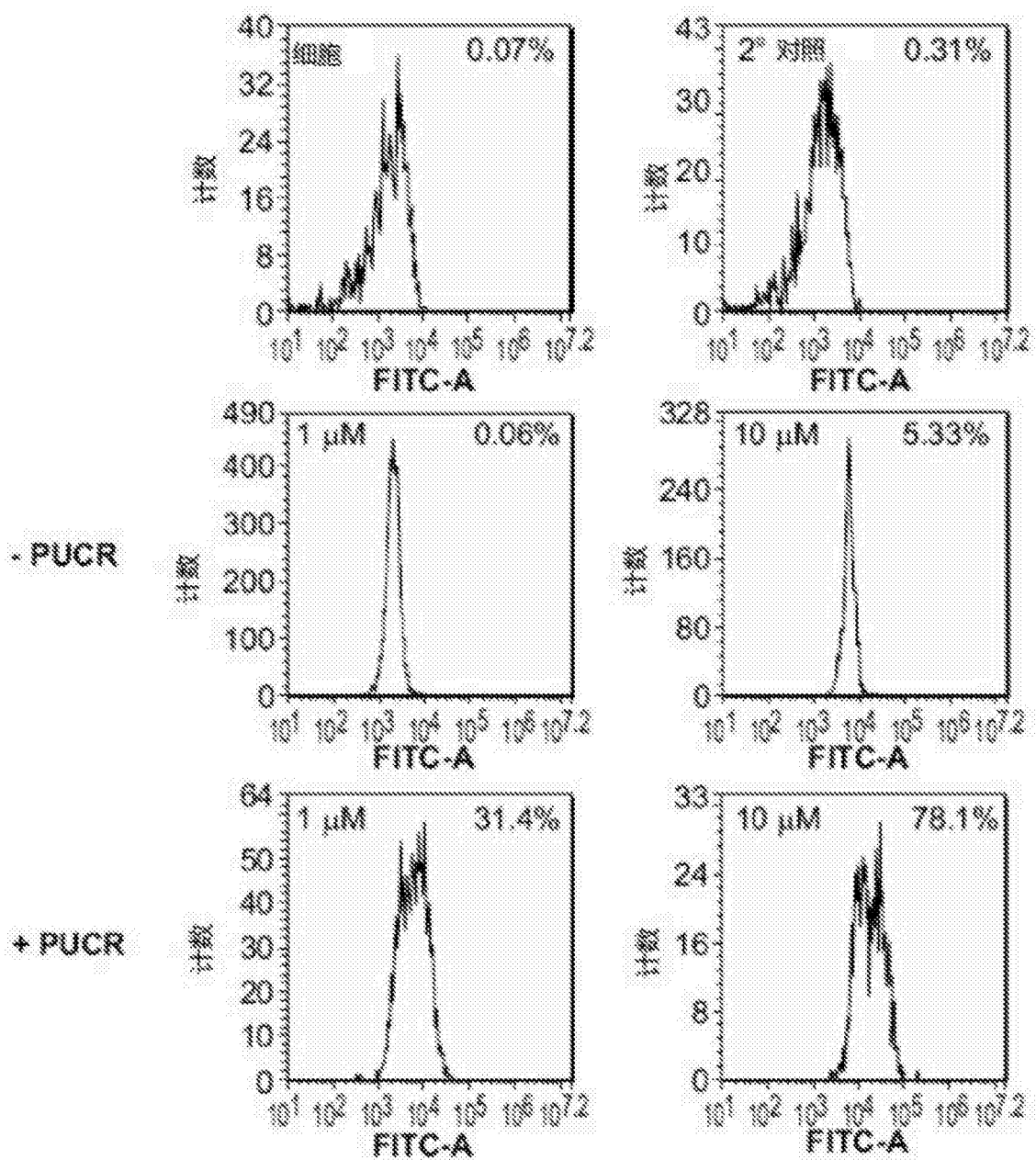


图12

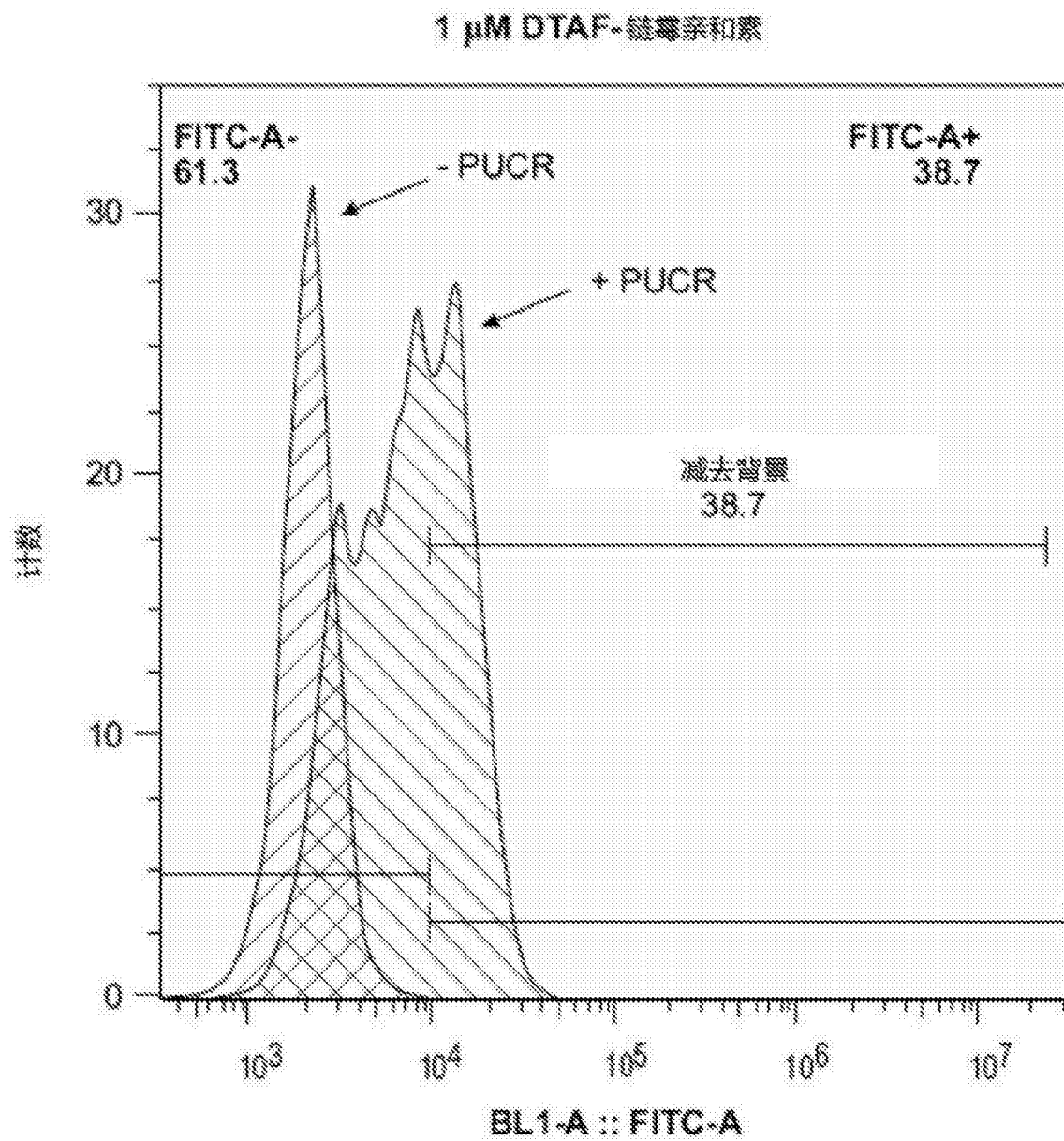


图13

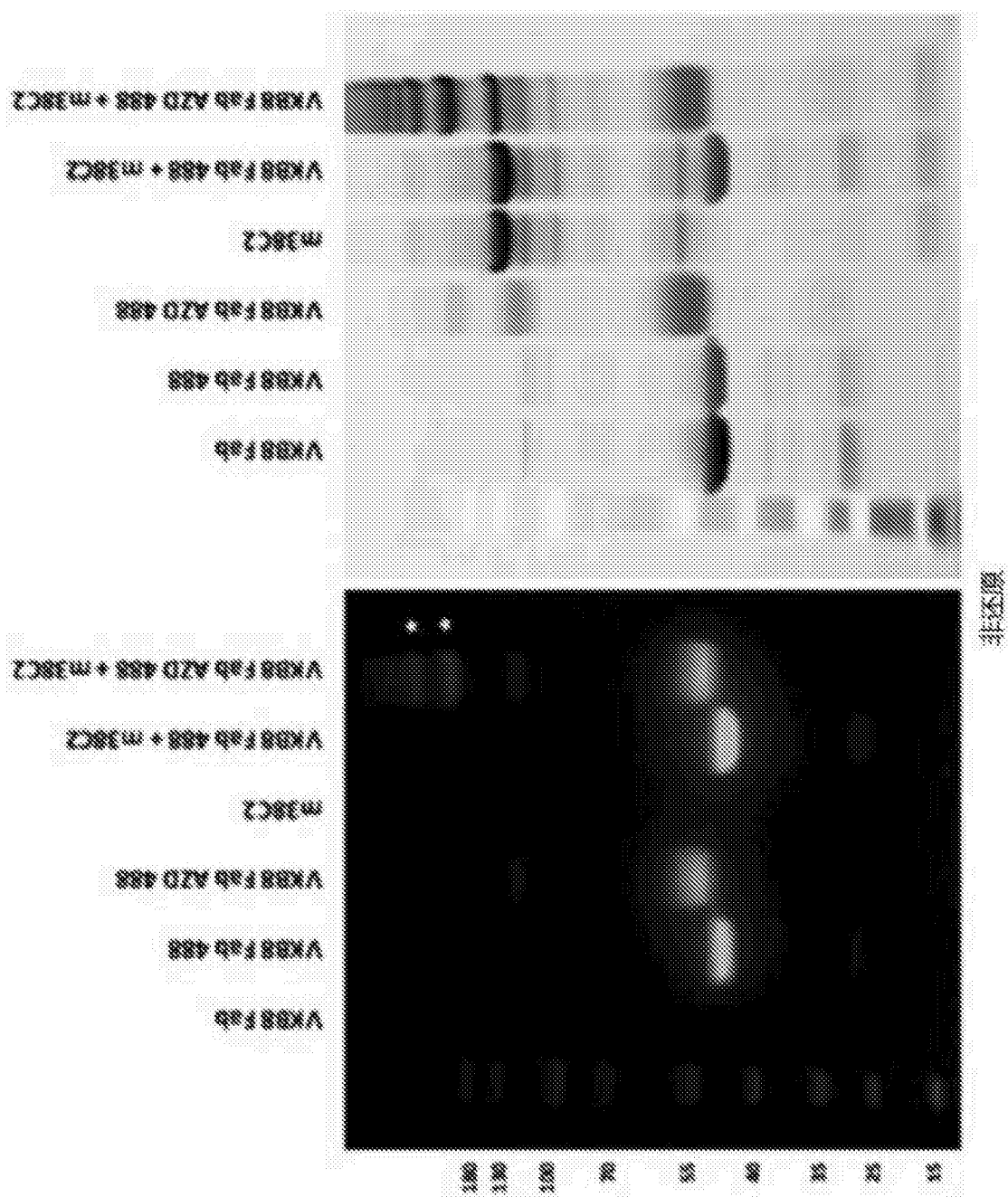


图14

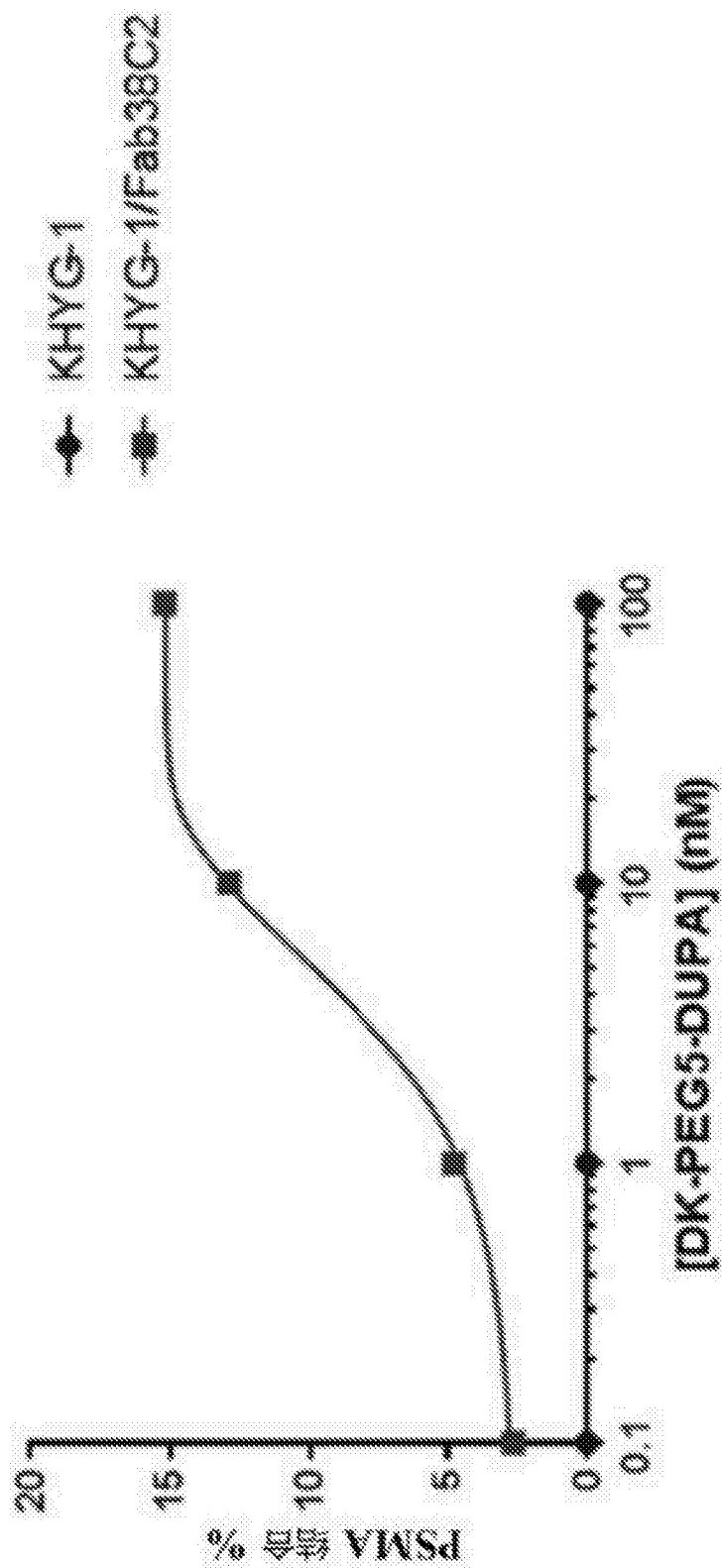


图15

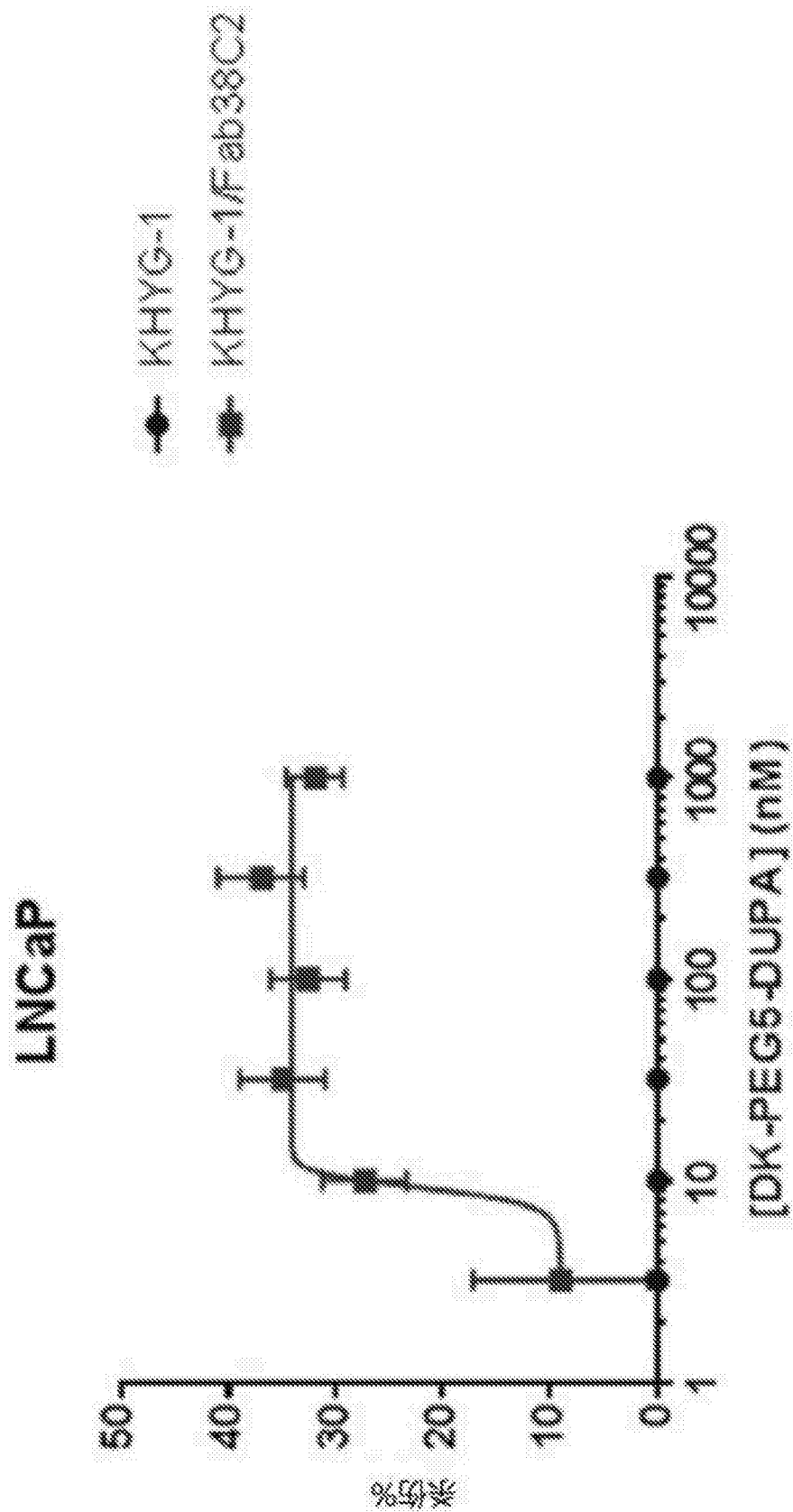


图16A

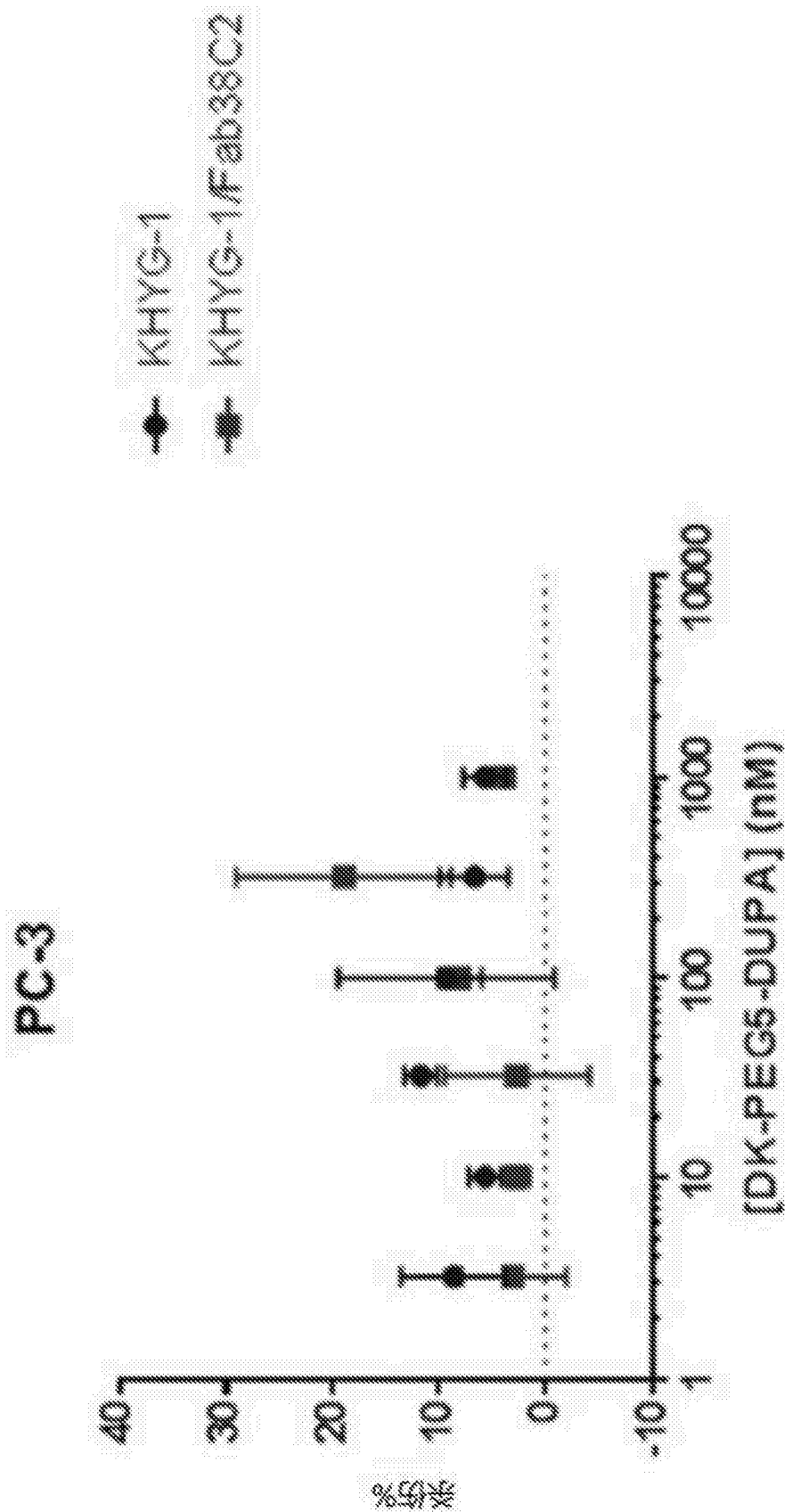


图16B

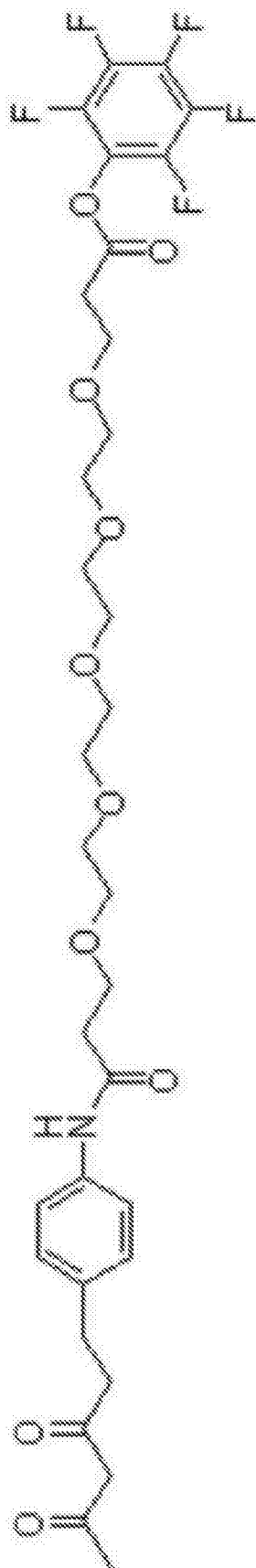


图17

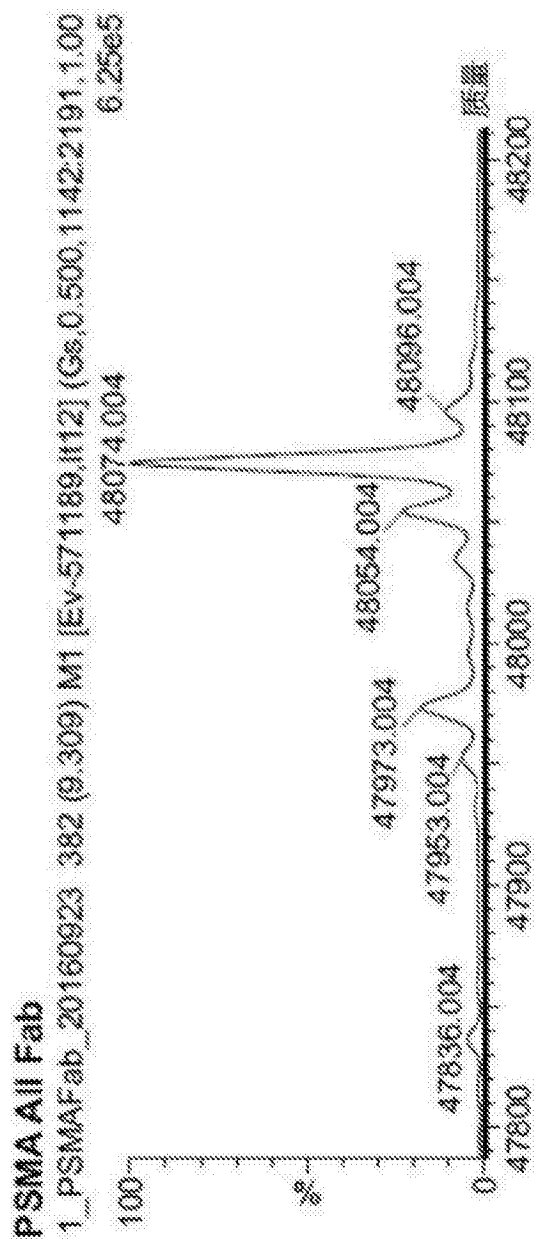


图18A

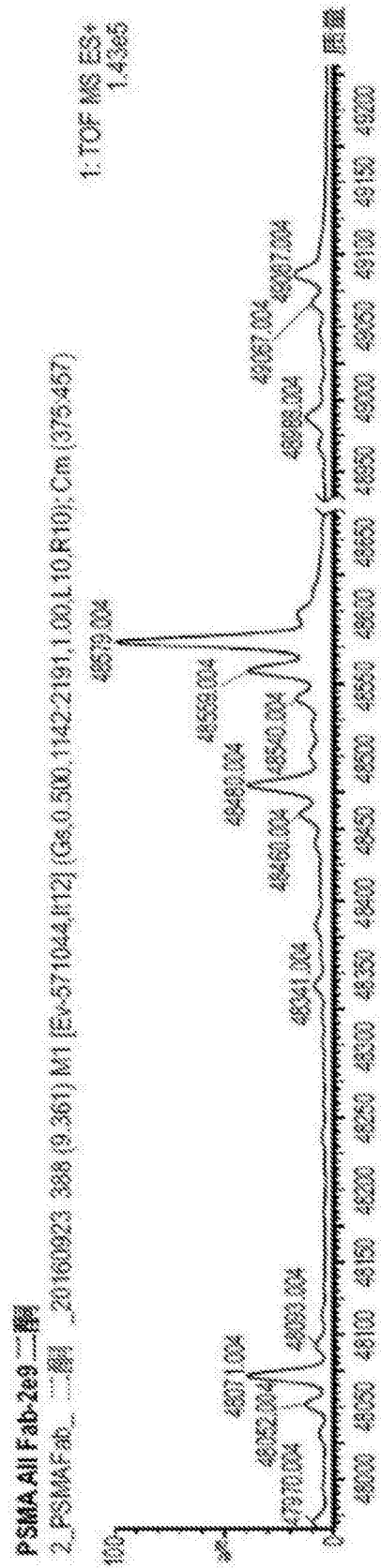


图18B

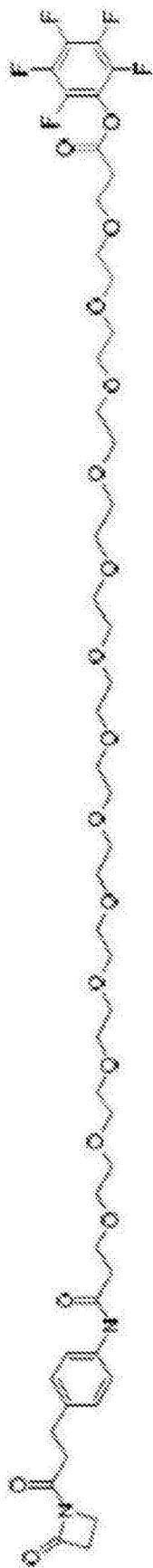


图19