



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115151639 A

(43) 申请公布日 2022.10.04

(21) 申请号 202180016268.2

(22) 申请日 2021.02.26

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2020/076937 2020.02.27 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2021/078203 2021.02.26

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/170100 EN 2021.09.02

(71) 申请人 南京传奇生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技小镇6号楼

(72) 发明人 范晓虎 毛杰 庄秋传 王瑞雪

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 刘晓杰 张奎燕

(51) Int.Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书8页 说明书104页
序列表110页 附图23页

(54) 发明名称

靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3) 的抗体和嵌合抗原受体及其使用方法

(57) 摘要

本申请提供了抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3) 抗体或其抗原结合片段, 以及结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3) 的嵌合抗原受体 (CAR), 该嵌合抗原受体在细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域中含有抗GPC3抗体。用所披露的CAR构建体转导的免疫效应细胞可用于癌症免疫疗法。

1. 一种结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3) 的抗体或其抗原结合片段, 该抗体或其抗原结合片段包含

包含选自由SEQ ID NO:1-10组成的组的氨基酸序列的HCDR1、包含选自由SEQ ID NO:11-20组成的组的氨基酸序列的HCDR2和包含选自由SEQ ID NO:21-30组成的组的氨基酸序列的HCDR3, 以及

包含选自由SEQ ID NO:31-40组成的组的氨基酸序列的LCDR1、包含选自由SEQ ID NO:41-50组成的组的氨基酸序列的LCDR2和包含选自由SEQ ID NO:51-60组成的组的氨基酸序列的LCDR3。

2. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段, 其中

(i) 该HCDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列, 或

(ii) 该HCDR1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列, 或

(iii) 该HCDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列, 或

(iv) 该HCDR1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列, 或

(v) 该HCDR1包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列, 或

(vi) 该HCDR1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列, 或

(vii) 该HCDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列, 或

(viii) 该HCDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列, 或

(ix) 该HCDR1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列, 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列, 或

(x) 该HCDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列, 该HCDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列, 该HCDR3包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列, 该LCDR1包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列, 该

LCDR2包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且该LCDR3包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段,其包含

(i) 包含与SEQ ID NO:61的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(ii) 包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(iii) 包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:73的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(iv) 包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:74的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(v) 包含与SEQ ID NO:65的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:75的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(vi) 包含与SEQ ID NO:66的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(vii) 包含与SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(viii) 包含与SEQ ID NO:68的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(ix) 包含与SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(x) 包含与SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xi) 包含与SEQ ID NO:117的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xii) 包含与SEQ ID NO:118的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xiii) 包含与SEQ ID NO:119的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xiv) 包含与SEQ ID NO:120的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xv) 包含与SEQ ID NO:121的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xvi) 包含与SEQ ID NO:122的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结

构域和包含与SEQ ID NO:123的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xvii) 包含与SEQ ID NO:117的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:124的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xviii) 包含与SEQ ID NO:118的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:124的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xix) 包含与SEQ ID NO:119的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:124的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xx) 包含与SEQ ID NO:120的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:124的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxi) 包含与SEQ ID NO:121的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:124的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxii) 包含与SEQ ID NO:122的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:124的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxiii) 包含与SEQ ID NO:117的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxiv) 包含与SEQ ID NO:118的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxv) 包含与SEQ ID NO:119的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxvi) 包含与SEQ ID NO:120的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxvii) 包含与SEQ ID NO:121的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxviii) 包含与SEQ ID NO:122的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含

(i) 包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL结构域,或

(ii) 包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL结构域,或

(iii) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL结构域,或

(iv) 包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL结构域,或

(v) 包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL结构域,或

(vi) 包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL结构域,或

(vii) 包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL结构域,或

(viii) 包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL结构域,或

(ix) 包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的VL结构域,或

(x) 包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL结构域,或

(xi) 包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或

(xii) 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或

(xiii) 包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或

(xiv) 包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或

(xv) 包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或

(xvi) 包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或

(xvii) 包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或

(xviii) 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或

(xix) 包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或

(xx) 包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序

列的VL结构域,或

(xxi) 包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxii) 包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxiii) 包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxiv) 包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxv) 包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxvi) 包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxvii) 包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或

(xxviii) 包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、单链可变片段(scFv)或二硫键稳定的可变片段(dsFv)。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其包含与SEQ ID NO:81-90、128和129中的任一个具有至少80%同一性的氨基酸序列。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体,其中该抗体是IgG。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体,其中该抗体是人源化抗体。

9. 一种核酸分子,其编码如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

10. 一种载体,其包含如权利要求9所述的核酸分子。

11. 一种宿主细胞,其用如权利要求10所述的载体转化。

12. 一种组合物,其包含治疗有效量的如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段、如权利要求9所述的核酸分子或如权利要求10所述的载体,以及药学上可接受的载剂。

13. 一种治疗患有表达GPC3的癌症的患者的方法,该方法包括向该患者施用如权利要求12所述的组合物,其中任选地,该癌症选自以下组成的组:肝细胞癌(HCC)、黑色素瘤、卵巢透明细胞癌(OCCC)、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌、结肠直肠癌和甲状腺癌。

14. 一种检测组织样品中的GPC3的方法,该方法包括使该组织样品与如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段接触;以及检测该抗体与该组织样品的结合,其中与该抗体与对照样品的结合相比,该抗体与该组织样品的结合的增加检测该组织样品中的GPC3。

15. 如权利要求14所述的方法,其中用可检测标记直接标记该抗体。

16. 如权利要求14或15所述的方法,其进一步包括使特异性结合该抗体的第二抗体与该组织样品接触,以及检测该第二抗体的结合,其中与该第二抗体与对照样品的结合相比,该第二抗体与该组织样品的结合的增加检测该组织样品中的GPC3。

17. 如权利要求14-16中任一项所述的方法,其中该组织样品包含以下项的细胞:肝细胞癌(HCC)、黑色素瘤、卵巢透明细胞癌(OCCC)、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌、结肠直肠癌、甲状腺癌和/或食道癌。

18. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含多肽,该多肽包含:

(a) 细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域包含如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段;

(b) 跨膜结构域;以及

(c) 细胞内信号传导结构域。

19. 如权利要求18所述的CAR,其中该抗体或抗原结合片段是scFv。

20. 如权利要求18或19所述的CAR,其进一步包含位于该多肽的N-末端的信号肽。

21. 如权利要求20所述的CAR,其中该信号肽源自选自自由CD8 α 、GM-CSF受体 α 和IgG1重链组成的组的分子。

22. 如权利要求18-21中任一项所述的CAR,其进一步包含位于该细胞外抗原结合结构域的C-末端和该跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域。

23. 如权利要求22所述的CAR,其中该铰链结构域源自CD8 α 。

24. 如权利要求18-23中任一项所述的CAR,其中该跨膜结构域源自选自自由CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组的分子。

25. 如权利要求18-24中任一项所述的CAR,其中该细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。

26. 如权利要求25所述的CAR,其中该共刺激信号传导结构域源自选自自由以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、HVEM、ICOS、Myd88、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合。

27. 如权利要求18-26中任一项所述的CAR,其中该细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。

28. 如权利要求27所述的CAR,其中该初级细胞内信号传导结构域源自CD3 ζ 。

29. 如权利要求18-28中任一项所述的CAR,其包含多肽,该多肽包含

(i) SEQ ID NO:91的氨基酸序列,或

(ii) SEQ ID NO:92的氨基酸序列,或

(iii) SEQ ID NO:93的氨基酸序列,或

(iv) SEQ ID NO:94的氨基酸序列,或

(v) SEQ ID NO:95的氨基酸序列,或

(vi) SEQ ID NO:96的氨基酸序列,或

(vii) SEQ ID NO:97的氨基酸序列,或

(viii) SEQ ID NO:98的氨基酸序列,或
(ix) SEQ ID NO:99的氨基酸序列,或
(x) SEQ ID NO:100的氨基酸序列,或
(xi) SEQ ID NO:107的氨基酸序列,或
(xii) SEQ ID NO:108的氨基酸序列,或
(xiii) SEQ ID NO:109的氨基酸序列,或
(xiv) SEQ ID NO:110的氨基酸序列,或
(xv) SEQ ID NO:111的氨基酸序列,或
(xvi) SEQ ID NO:112的氨基酸序列,或
(xvii) SEQ ID NO:113的氨基酸序列,或
(xviii) SEQ ID NO:114的氨基酸序列,或
(xix) SEQ ID NO:115的氨基酸序列,或
(xx) SEQ ID NO:116的氨基酸序列,或
(xxi) SEQ ID NO:130的氨基酸序列,或
(xxii) SEQ ID NO:131的氨基酸序列。

30. 一种多肽,其包含如权利要求18-29中任一项所述的CAR,其中该多肽进一步包含IL-12的p40亚基和/或CCL-19。

31. 如权利要求30所述的多肽,其中p40是包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的人p40,并且其中CCL-19是包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的人CCL-19。

32. 如权利要求30或权利要求31所述的多肽,其中p40和CCL-19通过第一自切割肽连接。

33. 如权利要求32所述的多肽,其中该第一自切割肽是包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的2A自切割肽T2A片段。

34. 如权利要求30-33中任一项所述的多肽,其中IL-12的p40亚基和CCL-19存在于包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的结构域中。

35. 如权利要求34所述的多肽,其中该CAR通过第二自切割肽连接到该结构域。

36. 如权利要求35所述的多肽,其中该第二自切割肽是包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的2A自切割肽P2A片段。

37. 如权利要求30-36中任一项所述的多肽,其包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

38. 一种核酸分子,其编码如权利要求18-29中任一项所述的CAR或如权利要求30-37中任一项所述的多肽。

39. 一种载体,其包含如权利要求38所述的核酸分子。

40. 如权利要求39所述的载体,其中该载体是病毒载体或非病毒载体。

41. 一种宿主细胞,其用如权利要求39或40所述的载体转化。

42. 如权利要求41所述的宿主细胞,其中该宿主细胞是选自由以下组成的组的免疫效应细胞:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及它们的组合。

43. 一种免疫效应细胞,其表达(i)如权利要求18-29中任一项所述的CAR,(ii)外源引入的p40,以及(iii)外源引入的CCL-19。

44. 一种组合物,其包含治疗有效量的如权利要求41或权利要求42所述的宿主细胞或如权利要求43所述的免疫效应细胞,以及药学上可接受的载剂。

45. 一种治疗患有表达GPC3的癌症的患者的方法,该方法包括向该患者施用如权利要求44所述的组合物,其中该癌症任选地选自以下组成的组:肝细胞癌(HCC)、黑色素瘤、卵巢透明细胞癌(OCCC)、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌、结肠直肠癌、甲状腺癌和食道癌。

46. 如权利要求45所述的方法,其中从该患者获得该宿主细胞或该免疫效应细胞。

47. 如权利要求45所述的方法,其中从健康供体获得该宿主细胞或该免疫效应细胞。

48. 如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中该GPC3包含选自以下GenBank登录号中的至少一者的氨基酸序列:NM_001164617和NP_001158089、NM_004484和NP_004475、NM_001164618和NP_001158090、以及NM_001164619和NP_001158091。

49. 如权利要求18-29中任一项所述的CAR或如权利要求30-37中任一项所述的多肽,其中该GPC3包含选自以下GenBank登录号中的至少一者的氨基酸序列:NM_001164617和NP_001158089、NM_004484和NP_004475、NM_001164618和NP_001158090、以及NM_001164619和NP_001158091。

靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3) 的抗体和嵌合抗原受体及其使用方法

交叉引用

[0001] 本申请要求于2020年2月27日提交的国际专利申请号PCT/CN2020/076937的优先权权益,其内容通过援引以其全文并入本文。

序列表

[0002] 本申请通过援引结合了与本申请一起提交的序列表,该序列表为文本格式,标题为“14651-019-228_SEQ_LISTING”,创建于2021年2月23日,大小为226,307字节。

1. 技术领域

[0003] 本披露涉及靶向GPC3的抗体、嵌合抗原受体和工程化免疫细胞及其使用方法的领域。

2. 背景技术

[0004] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3, 一种由580个氨基酸组成的65-kDa蛋白) 是一种通过糖基磷脂酰肌醇锚定到细胞膜的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖。与两条硫酸乙酰肝素链结合的是各种重要的蛋白,包括成纤维细胞生长因子和Wnt。乙酰肝素链在功能方面尚未完全确定,但据信它控制结合蛋白与相应受体的结合。GPC3在肝细胞癌 (HCC)、卵巢透明细胞癌 (OCCC)、黑色素瘤、肺鳞状细胞癌、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤 (维尔姆斯瘤) 和卵黄囊瘤以及某些胃癌 (例如产生甲胎蛋白的胃癌) 中表达。分泌型和膜锚定型GPC3在这些癌症中的确切功能尚不完全清楚,但已证明它与肿瘤转化有关,例如在HCC中 (Shirakawa H. 等人, Cancer Sci. 2009; 100: 1403-1407)。引人注目的是,该蛋白在所有其他癌症形式中几乎不存在。基于这些特征, GPC3是癌症免疫疗法的潜在理想靶标。本领域需要新的抗GPC3抗体和免疫疗法,例如GPC3CAR-T疗法。

3. 发明内容

[0005] 在一方面,本文提供了结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3) 的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含选自由SEQ ID NO:1-10组成的组的HCDR1、选自由SEQ ID NO:11-20组成的组的HCDR2和选自由SEQ ID NO:21-30组成的组的HCDR3;以及选自由SEQ ID NO:31-40组成的组的LCDR1、选自由SEQ ID NO:41-50组成的组的LCDR2和选自由SEQ ID NO:51-60组成的组的LCDR3。

[0006] 在一些实施例中,在本文提供的抗体或抗原结合片段中, (i) HCDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列, HCDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列, HCDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列, LCDR1包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列, LCDR2包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列, 并且LCDR3包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列, 或 (ii) HCDR1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列, HCDR2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列, HCDR3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列, LCDR1包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列, LCDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列, 并且LCDR3包含SEQ

ID NO:52的氨基酸序列,或(iii)HCDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,或(iv)HCDR1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列,或(v)HCDR1包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列,或(vi)HCDR1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列,或(vii)HCDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,或(viii)HCDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列,或(ix)HCDR1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列,或(x)HCDR1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,HCDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,HCDR3包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,LCDR1包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且LCDR3包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含(i)包含与SEQ ID NO:61的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或(ii)包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或(iii)包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:73的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或(iv)包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:74的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或(v)包含与SEQ ID NO:65的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:75的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或(vi)包含与SEQ ID NO:66的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或(vii)包含与SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域,或(viii)包含与SEQ ID NO:68的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列具有至少

列的VH结构域和包含与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0008] 在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含(i)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的VL结构域,或(ii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VL结构域,或(iii)包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VL结构域,或(iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL结构域,或(v)包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL结构域,或(vi)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VL结构域,或(vii)包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL结构域,或(viii)包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL结构域,或(ix)包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的VL结构域,或(x)包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL结构域,或(xi)包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或(xii)包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或(xiii)包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或(xiv)包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或(xv)包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或(xvi)包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列的VL结构域,或(xvii)包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或(xviii)包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或(xix)包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或(xx)包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或(xxi)包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或(xxii)包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的VL结构域,或(xxiii)包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或(xxiv)包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或(xxv)包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或(xxvi)包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或(xxvii)包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域,或(xxviii)包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列的VL结构域。

[0009] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、单链可变片段(scFv)或二硫键稳定的可变片段(dsFv)。

[0010] 在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:81-90、128和129中的任一个具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施例中,抗体是IgG。在一些实施例中,抗体是人源化抗体。

[0012] 在另一方面,本文提供了编码本文提供的抗体或抗原结合片段的核酸分子。在其他方面,本文提供了包含本文提供的核酸分子的载体。

[0013] 在其他方面,本文提供了用本文提供的载体转化的宿主细胞。

[0014] 在其他方面,本文提供了包含治疗有效量的本文提供的抗体或抗原结合片段、核酸分子或载体和药学上可接受的载剂的组合物。

[0015] 在其他方面,本文提供了治疗患有表达GPC3的癌症的患者的方法,该方法包括向患者施用本文提供的组合物,其中任选地,该癌症选自由以下组成的组:肝细胞癌(HCC)、黑色素瘤、卵巢透明细胞癌(OCCC)、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌、结肠直肠癌、甲状腺癌和食道癌。

[0016] 在其他方面,本文提供了检测组织样品中的GPC3的方法,该方法包括使组织样品与本文提供的抗体或抗原结合片段接触;以及检测抗体与组织样品的结合,其中与抗体与对照样品的结合相比,抗体与组织样品的结合的增加检测组织样品中的GPC3。

[0017] 在一些实施例中,用可检测标记直接标记抗体。

[0018] 在一些实施例中,该方法进一步包括使特异性结合抗体的第二抗体与组织样品接触,以及检测第二抗体的结合,其中与第二抗体与对照样品的结合相比,第二抗体与组织样品的结合的增加检测组织样品中的GPC3。在一些实施例中,组织样品包含以下项的细胞:肝细胞癌(HCC)、黑色素瘤、卵巢透明细胞癌(OCCC)、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌、结肠直肠癌、甲状腺癌和/或食道癌。

[0019] 在其他方面,本文提供了嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体包含多肽,该多肽包含:(a)细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域包含本文提供的抗体或抗原结合片段;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。

[0020] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段是scFv。

[0021] 在一些实施例中,本文提供的CAR进一步包含位于多肽的N-末端的信号肽。在一些实施例中,信号肽源自选自由CD8 α 、GM-CSF受体 α 和IgG1重链组成的组的分子。

[0022] 在一些实施例中,CAR进一步包含位于细胞外抗原结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域。在一些实施例中,该铰链结构域源自CD8 α 。

[0023] 在一些实施例中,跨膜结构域源自选自由CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组的分子。

[0024] 在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施例中,该共刺激信号传导结构域源自选自由以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、HVEM、ICOS、Myd88、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合。

[0025] 在一些实施例中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该初级细胞内信号传导结构域源自CD3 ζ 。

[0026] 在一些实施例中,本文提供的CAR包含多肽,该多肽包含(i)SEQ ID NO:91的氨基酸序列,或(ii)SEQ ID NO:92的氨基酸序列,或(iii)SEQ ID NO:93的氨基酸序列,或(iv)SEQ ID NO:94的氨基酸序列,或(v)SEQ ID NO:95的氨基酸序列,或(vi)SEQ ID NO:96的氨基酸序列,或(vii)SEQ ID NO:97的氨基酸序列,或(viii)SEQ ID NO:98的氨基酸序列,或(ix)SEQ ID NO:99的氨基酸序列,或(x)SEQ ID NO:100的氨基酸序列,或(xi)SEQ ID NO:107的氨基酸序列,或(xii)SEQ ID NO:108的氨基酸序列,或(xiii)SEQ ID NO:109的氨基酸序列,或(xiv)SEQ ID NO:110的氨基酸序列,或(xv)SEQ ID NO:111的氨基酸序列,或(xvi)SEQ ID NO:112的氨基酸序列,或(xvii)SEQ ID NO:113的氨基酸序列,或(xviii)SEQ ID NO:114的氨基酸序列,或(xix)SEQ ID NO:115的氨基酸序列,或(xx)SEQ ID NO:116的氨基酸序列,或(xxi)SEQ ID NO:130的氨基酸序列,或(xxii)SEQ ID NO:131的氨基酸序列。

[0027] 在另一方面,本文提供了一种多肽,该多肽包含:本文提供的CAR,以及IL-12的p40亚基和CCL-19中的至少一种。在一些实施例中,p40是包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的人p40,并且CCL-19是包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的人CCL-19。在一些实施例中,p40和CCL-19通过第一自切割肽连接。在一些实施例中,第一自切割肽是包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的2A自切割肽T2A片段。在一些实施例中,IL-12的p40亚基和CCL-19存在于包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的结构域中。在一些实施例中,CAR通过第二自切割肽连接到结构域。在一些实施例中,第二自切割肽是包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的2A自切割肽P2A片段。在具体的实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的多肽。

[0028] 在其他方面,本文提供了编码本文提供的CAR或多肽的核酸分子。在其他方面,本文提供了包含核酸分子的载体。在一些实施例中,载体是病毒载体或非病毒载体。

[0029] 在其他方面,本文提供了用本文提供的载体转化的宿主细胞。在一些实施例中,宿主细胞是选自以下组成的组的免疫效应细胞:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及它们的组合。在具体的实施例中,免疫效应细胞是T细胞。

[0030] 在其他方面,本文提供了表达本文提供的CAR、外源引入的p40和外源引入的CCL-19的免疫效应细胞。

[0031] 在其他方面,本文提供了包含治疗有效量的本文提供的宿主细胞或免疫效应细胞和药学上可接受的载剂的组合物。

[0032] 在其他方面,本文提供了治疗患有表达GPC3的癌症的患者的方法,该方法包括向患者施用本文提供的组合物,其中该癌症任选地选自以下组成的组:肝细胞癌(HCC)、黑色素瘤、卵巢透明细胞癌(OCCC)、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌、结肠直肠癌、甲状腺癌和食道癌。

[0033] 在一些实施例中,从患者获得宿主细胞或免疫效应细胞。在一些实施例中,从健康供体获得宿主细胞或免疫效应细胞。

[0034] 在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段或CAR结合GPC3,该GPC3包含选自以下GenBank登录号中的至少一者的氨基酸序列:NM_001164617和NP_001158089、NM_

004484和NP_004475、NM_001164618和NP_001158090、以及NM_001164619和NP_001158091。

4. 附图说明

[0035] 图1显示了LIC19301-LIC19310 CAR-T细胞的表达水平。

[0036] 图2显示了在不同的E/T比率下LIC19301-LIC19310的CAR-T细胞针对GPC3阳性细胞系的体外细胞毒性。E/T是指效应细胞与靶细胞的比率。UnT是指未用CAR电穿孔的T细胞。

[0037] 图3显示了在不同的E/T比率下LIC19301-LIC19310的CAR-T细胞针对GPC3阴性细胞系的体外细胞毒性。E/T是指效应细胞与靶细胞的比率。UnT是指未用CAR电穿孔的T细胞。

[0038] 图4显示了LIC19301-LIC19310的CAR-T细胞与Huh7或SK-HEP1共培养24小时后的细胞因子分泌。UnT是指未用CAR电穿孔的T细胞。

[0039] 图5显示了施用给移植了Huh7细胞的NCG小鼠后LIC19309 CAR-T细胞的抗肿瘤活性。

[0040] 图6显示了人源化CAR-T细胞的表达水平。

[0041] 图7显示了在不同的E/T比率下人源化CAR-T细胞和LIC19309 CAR-T细胞针对GPC3阳性细胞系的体外细胞毒性。E/T是指效应细胞与靶细胞的比率。UnT是指未用CAR转染的T细胞。

[0042] 图8显示了在不同的E/T比率下人源化CAR-T细胞和LIC19309 CAR-T细胞针对GPC3阴性细胞系的体外细胞毒性。E/T是指效应细胞与靶细胞的比率。UnT是指未用CAR转染的T细胞。

[0043] 图9显示了人源化CAR-T细胞和LIC19309 CAR-T细胞在与HepG2、Huh7或PLC/PRF/5细胞系以不同的E/T比率共培养20小时之前和之后的IFN- γ 分泌情况。UnT是指未用CAR转染的T细胞。

[0044] 图10显示了人源化CAR-T细胞和LIC19309 CAR-T细胞在与HepG2、Huh7或PLC/PRF/5细胞系以不同的E/T比率共培养20小时之前和之后的TNF- α 分泌情况。UnT是指未用CAR转染的T细胞。

[0045] 图11显示了施用给移植了Huh7细胞的NCG小鼠后人源化CAR-T细胞的抗肿瘤活性。

[0046] 图12显示了H93 CAR和H93M CAR的结构。SP是指信号肽。TM是指跨膜结构域。TAA结合剂是指肿瘤相关抗原的抗原结合结构域或结合剂(即抗GPC3scFv)。

[0047] 图13显示了表达人源化抗GPC3 scFv CAR的H93 CAR-T细胞和H93MCAR-T细胞的阳性比率。UnT是指未用CAR转导的T细胞。

[0048] 图14A至图14B显示了在正常条件(RPMI-1640+300IU/mL IL-2)下培养的CAR-T细胞的IL-23(图14A)和CCL-19(图14B)蛋白的产生。

[0049] 图15A至图15B显示了在再攻击测定中CAR-T细胞的扩增。每2天用PLC/PRF/5细胞以1:1E/T比率刺激细胞过夜。在每轮结束时记录T细胞的扩增倍数(图15A)和活力(图15B)。

[0050] 图16A至图16C显示了在再攻击测定中在用不同刺激轮数处理后在1:1E/T比率下CAR-T细胞针对GPC3阳性细胞系的体外细胞毒性(图16A)、TNF- α 释放水平(图16B)和IFN- γ 释放水平(图16C)。

[0051] 图17显示了在再攻击测定中在用不同刺激轮数处理后CAR-T细胞的阳性比率。

[0052] 图18A至图18D显示了在再攻击测定中在每个刺激轮次后24小时CAR-T细胞中PD-1

(图18A和图18B)和LAG3(图18C和图18D)的表达。

[0053] 图19A至图19B显示了通过96孔transwell室进行的CAR-T细胞的细胞迁移测定。将不同的CAR-T细胞与PLC/PRF/5细胞以1:1E/T比率共培养30小时,收集细胞培养上清液并添加到下室。对4、6、8小时后从上室迁移的下室的T细胞数(图19A),以及共培养上清液中CCL-19的浓度(图19B)进行定量。

[0054] 图20A至图20D显示了CAR-T细胞在NCG小鼠异种移植模型中的抗肿瘤作用。将NCG小鼠用Huh7细胞皮下接种,并用0.2M剂量和0.6M剂量的CAR-T细胞处理(i.v.) (n=4只小鼠每组)。评估肿瘤体积(图20A和图20B)和NCG小鼠外周血的基因组DNA中的CAR拷贝数(图20C和图20D)。

[0055] 图21A至图21B显示了在NCG小鼠异种移植模型中,用0.2M(图21A)和0.6M(图21B)剂量的CAR-T细胞处理的小鼠(n=4只小鼠每组)的体重变化。

[0056] 图22A至图22D显示了在用0.2M或0.6M剂量的CAR-T细胞处理后NCG小鼠外周血中IL-23蛋白(图22A和图22B)和IFN- γ 蛋白(图22C和图22D)的水平(n=3只小鼠每组)。

[0057] 图23显示了在NCG小鼠异种移植模型中在动物实验终点(n=3)用0.2M UnT、H93 CAR-T细胞或H93M CAR-T细胞处理的小鼠的肿瘤组织中T细胞的浸润情况。肿瘤组织用福尔马林固定,包埋在石蜡中并用于免疫组织化学(IHC)以检测用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色的T细胞的浸润情况。通过3D HISTECH (DRNJIER)获得图像。右列表示黑色矩形的放大区域。

[0058] 图24显示了在NCG小鼠异种移植模型中用0.2M UnT、H93 CAR-T细胞或H93M CAR-T细胞处理后,小鼠巨噬细胞和小鼠树突状细胞在肿瘤组织中的募集情况。在动物实验的终点,肿瘤组织用福尔马林固定,包埋在石蜡中并用于免疫组织化学(IHC)。用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色具有CD68的巨噬细胞(左列)和具有CD11c的树突状细胞(右列)。通过3D HISTECH (DRNJIER)获得图像。

5. 具体实施方式

[0059] 本披露部分基于结合GPC3的新型抗体和嵌合抗原受体或包含它们的工程化细胞,以及它们的改善的性质。

5.1. 定义

[0060] 本文描述或引用的技术和程序包括本领域技术人员通常充分理解和/或使用常规方法通常采用的那些,例如,在以下文献中描述的广泛使用的方法: Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第3版, 2001); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑, 2003); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An编辑2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Albitar编辑2010); 以及 *Antibody Engineering* 第1卷和第2卷 (Kontermann和Dübel编辑, 第2版, 2010)。除非本文另外定义, 否则, 本发明中使用的技术和科学术语具有本领域普通技术人员所通常理解的含义。出于解释本说明书的目的, 将应用以下对术语的描述, 并且在任何适当的时候, 以单数形式使用的术语也将包括复数, 反之亦然。在所陈述的术语的任何描述与通过援引并入本文的任何文献冲突的情况下, 应以下文所陈述的术语的描述为准。

[0061] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文中可互换使用, 并以最广泛的含义使用,

并且具体地涵盖例如单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长或完整单克隆抗体)、具有多表位或单表位特异性的抗体组合物、多克隆或单价抗体、多价抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要它们表现出所需的生物活性)、单链抗体及其片段(例如,结构域抗体),如下所述。抗体可以是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和/或亲和力成熟抗体,以及来自其他物种(例如小鼠、兔、美洲驼等)的抗体。术语“抗体”旨在包括免疫球蛋白类多肽中的B细胞的多肽产物,其能够结合特定分子抗原并且由两对相同的多肽链组成,其中每对多肽链具有一条重链(约50-70kDa)和一条轻链(约25kDa),每条链的每个氨基末端部分包括约100至约130或更多个氨基酸的可变区,并且每条链的每个羧基末端部分包括恒定区。参见例如Antibody Engineering (Borrebaeck编辑,第2版,1995)和Kuby, Immunology (第3版,1997)。抗体还包括但不限于合成抗体、重组产生的抗体、包括来自骆驼科物种(例如美洲驼或羊驼)的抗体或它们的人源化变体、内抗体、抗独特型(抗Id)抗体,以及上述任一种的功能片段(例如抗原结合片段),这些功能片段是指抗体重链或轻链多肽的一部分,其保留了该片段所来源的抗体的一些或全部结合活性。功能片段(例如,抗原结合片段)的非限制性实例包括单链Fv(scFv)(例如,包括单特异性、双特异性等)、Fab片段、F(ab')片段、F(ab)₂片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fv片段、双抗体、三抗体、四抗体和微型抗体。具体地,本文提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,例如,抗原结合结构域或含有结合抗原的抗原结合位点的分子(例如,抗体的一个或多个CDR)。此类抗体片段可以在例如以下文献中找到:Harlow和Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers编辑,1995); Huston等人, 1993, Cell Biophysics 22:189-224; Plückthun和Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515; 以及Day, Advanced Immunochimistry (第2版,1990)。本文提供的抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。抗体可以是激动性抗体或拮抗性抗体。抗体可以既不是激动性的也不是拮抗性的。

[0062] “抗原”是抗体可以选择性结合的结构。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或其他天然存在的或合成的化合物。在一些实施例中,靶抗原是多肽。在某些实施例中,抗原与细胞相关,例如,存在于细胞上或细胞中。

[0063] “完整”抗体是包含抗原结合位点以及CL和至少重链恒定区CH1、CH2和CH3的抗体。恒定区可以包括人恒定区或其氨基酸序列变体。在某些实施例中,完整抗体具有一种或多种效应子功能。

[0064] “单链Fv”(也缩写为“sFv”或“scFv”)是包含连接到单个多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽进一步包含在VH与VL结构域之间的多肽接头,该多肽接头使得sFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于sFv的综述,参见Plückthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0065] 术语“仅重链抗体”或“HCAb”是指功能性抗体,它包含重链,但缺少通常在4-链抗体中发现的轻链。众所周知,骆驼科动物(诸如骆驼、美洲驼或羊驼)会产生HCAb。

[0066] 术语“结合”是指分子之间的相互作用,包括例如形成复合物。相互作用可以是例如非共价相互作用,包括氢键、离子键、疏水相互作用和/或范德华相互作用。复合物还可以

包括通过共价或非共价键、相互作用或力结合在一起的两个或更多个分子的结合。抗体上的单个抗原结合位点与靶分子(诸如抗原)的单个表位之间的总非共价相互作用的强度是抗体或功能片段对该表位的亲和力。结合分子(例如抗体)与单价抗原的解离速率(k_{off})与缔合速率(k_{on})的比率(k_{off}/k_{on})是解离常数 K_D ,它与亲和力成反比。 K_D 值越低,抗体的亲和力越高。 K_D 值因抗体和抗原的不同复合物而异,并且取决于 k_{on} 和 k_{off} 。本文提供的抗体的解离常数 K_D 可以使用本文提供的任何方法或本领域技术人员熟知的任何其他方法来确定。在一个结合位点处的亲和力并不总是反映抗体与抗原之间相互作用的真实强度。当含有多个重复抗原决定簇的复合抗原(诸如多价抗原)与含有多个结合位点的抗体接触时,抗体与抗原在一个位点处的相互作用将增加在第二个位点处发生反应的可能性。多价抗体与抗原之间的这种多重相互作用的强度称为亲合力。

[0067] 关于本文所述的结合分子,术语诸如“结合”、“特异性结合”和类似术语在本文中也可互换使用,并且是指特异性结合抗原(诸如多肽)的抗原结合结构域的结合分子。结合或特异性结合抗原的结合分子或抗原结合结构域可以例如通过免疫测定、Octet[®]、Biacore[®]或本领域技术人员已知的其他技术来鉴定。在一些实施例中,当结合分子或抗原结合结构域以比结合任何交叉反应性抗原更高的亲和力结合抗原时,结合分子或抗原结合结构域结合或特异性结合抗原,如使用实验技术诸如放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)所测定的。典型地,特异性或选择性反应将至少为背景信号或噪声的两倍,并且可以是背景的10倍以上。参见例如Fundamental Immunology 332-36(Paul编辑,第2版,1989)关于结合特异性的讨论。在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域与“非靶”蛋白的结合程度小于结合分子或抗原结合结构域与其特定靶抗原的结合的约10%,例如,如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或RIA所测定的。结合抗原的结合分子或抗原结合结构域包括能够以足够的亲和力结合抗原以使得结合分子可用作例如靶向抗原的治疗剂和/或诊断剂的结合分子或抗原结合结构域。在某些实施例中,结合抗原的结合分子或抗原结合结构域具有小于或等于1 μ M、800nM、600nM、550nM、500nM、300nM、250nM、100nM、50nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM的解离常数(K_D)。在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域结合来自不同物种的抗原中保守的抗原表位。

[0068] 在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域可以包含“嵌合”序列,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们表现出所需的生物活性(参见美国专利号4,816,567和Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA81:6851-55)。嵌合序列可以包括人源化序列。

[0069] 在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域可以包含非人(例如,骆驼、鼠、非人灵长类动物)抗体的“人源化”形式的部分,这些非人抗体包括来自人免疫球蛋白(例如,受体抗体)的序列,其中天然CDR残基被来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(例如,供体抗体)诸如骆驼、小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的相应CDR的残基取代。在一些情况下,人免疫球蛋白序列的一个或多个FR区残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体性

能。人源化抗体重链或轻链可以包含基本上所有的至少一个或多个可变区,其中所有或基本上所有的CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,并且所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的FR。在某些实施例中,人源化抗体将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones等人,Nature 321:522-25(1986); Riechmann等人,Nature 332:323-29(1988);Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-96(1992);Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-89(1992);美国专利号6,800,738、6,719,971、6,639,055、6,407,213和6,054,297。

[0070] 在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域可以包含“完全人抗体”或“人抗体”的部分,其中这些术语在本文中可互换使用并且是指包含人可变区和例如人恒定区的抗体。结合分子可以包含抗体序列。在具体的实施例中,该术语是指包含人来源的可变区和恒定区的抗体。在某些实施例中,“完全人”抗体还可以涵盖结合多肽并且由核酸序列编码的抗体,这些核酸序列是人种系免疫球蛋白核酸序列的天然存在的体细胞变体。术语“完全人抗体”包括具有对应于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体,如Kabat等人(参见Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242)描述的。“人抗体”是这样一种抗体,其具有对应于由人类产生的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列和/或已经使用任何用于制造人抗体的技术来产生。人抗体的此定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581(1991))和酵母展示文库(Chao等人,Nature Protocols 1:755-68(2006))。也可用于制备人单克隆抗体的方法描述于以下文献中:Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77(1985);Boerner等人,J.Immunol.147(1):86-95(1991);以及van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)。人抗体可以通过将抗原施用于已被修饰以响应抗原攻击而产生此类抗体但其内源基因座已失效的转基因动物(例如小鼠)来制备(参见例如Jakobovits,Curr.Opin.Biotechnol.6(5):561-66(1995);Brüggemann和Taussing,Curr.Opin.Biotechnol.8(4):455-58(1997);以及关于XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体,还参见例如Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:3557-62(2006)。

[0071] 在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域可以包含“重组人抗体”的部分,其中该短语包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的人抗体,诸如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组的组合人抗体文库中分离的抗体、从对于人免疫球蛋白基因是转基因的和/或转染色体的动物(例如小鼠或牛)中分离的抗体(参见例如Taylor,L.D.等人,Nucl.Acids Res.20:6287-6295(1992))或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这种重组人抗体可以具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(参见Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242)。然而,在某些实施例中,对此类重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用人Ig序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列:它们虽然源自人种系VH和VL序列并与其相关,但在体内

可能不天然存在于人抗体种系库中。

[0072] 在某些实施例中,结合分子或抗原结合结构域可以包含“单克隆抗体”的一部分,其中如本文所用的术语是指从基本上同质的抗体的群体中获得的抗体,例如,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变或熟知的翻译后修饰(诸如氨基酸异构化或脱酰胺、甲硫氨酸氧化或者天冬酰胺或谷氨酰胺脱酰胺)之外,构成该群体的各个抗体是相同的,每种单克隆抗体通常将识别抗原上的单个表位。在具体的实施例中,如本文所用,“单克隆抗体”是由单个杂交瘤或其他细胞产生的抗体。术语“单克隆”不限于用于制备抗体的任何特定方法。例如,可用于本披露的单克隆抗体可以通过由Kohler等人,Nature 256:495(1975)首先描述的杂交瘤方法制备,或者可以使用重组DNA方法在细菌或真核动物或植物细胞中制备(参见例如美国专利号4,816,567)。“单克隆抗体”也可以使用例如Clackson等人,Nature 352:624-28(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-97(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离出来。制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其他方法是本领域熟知的。参见例如Short Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人编辑,第5版,2002)。

[0073] 典型的4-链抗体单元是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。在IgG的情况下,4-链单元通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键连接到H链,而两条H链根据H链同种型通过一个或多个二硫键彼此连接。每条H链和L链还具有规则间隔的链内二硫键。每条H链在N-末端处具有一个可变结构域(VH),对于 α 链和 γ 链中的每一个,其后面是三个恒定结构域(CH),而对于 μ 同种型和 ϵ 同种型,其后面是四个CH结构域。每条L链在N-末端处具有一个可变结构域(VL),在其另一端处具有一个恒定结构域(CL)。VL与VH对齐,CL与重链的第一恒定结构域(CH1)对齐。特定的氨基酸残基被认为在轻链和重链可变结构域之间形成界面。VH和VL的配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别抗体的结构和性质,参见例如Basic and Clinical Immunology 71(Stites等人编辑,第8版,1994)和Immunobiology(Janeway等人,第5版,2001)。

[0074] 术语“Fab”或“Fab区”是指结合抗原的抗体区。常规的IgG通常包含两个Fab区,每个Fab区位于Y形IgG结构的两个臂之一上。每个Fab区通常由重链和轻链各自的一个可变区和一个恒定区组成。更具体地,Fab区中重链的可变区和恒定区是VH区和CH1区,Fab区中轻链的可变区和恒定区是VL区和CL区。Fab区中的VH、CH1、VL和CL可以按各种方式排列以赋予根据本披露的抗原结合能力。例如,VH区和CH1区可以在一个多肽上,VL区和CL区可以在单独的多肽上,类似于常规IgG的Fab区。替代性地,VH、CH1、VL和CL区可以都在相同的多肽上,并且以不同的顺序取向,如下文部分中更详细描述。

[0075] 术语“可变区”、“可变结构域”、“V区”或“V结构域”是指抗体的轻链或重链的一部分,其通常位于轻链或重链的氨基末端,并且具有在重链中约120至130个氨基酸和在轻链中约100至110个氨基酸的长度,并且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。重链的可变区可以称为“VH”。轻链的可变区可以称为“VL”。术语“可变”是指抗体中可变区的某些区段在序列上存在很大不同的事实。V区介导抗原结合并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性并不是均匀分布在可变区的110个氨基酸范围内。而是,V区由约15-30个氨基酸的称为框架区(FR)的变化较小(例如,相对不变)的区段组成,这些区段由每个为约9-12个氨基酸长的称为“高变区”的变化较大(例如,极端变化)的较短区域隔开。重链和轻链的可变区各自包含主要采用 β 折叠构型的四个FR,它们通过三个高变区连接,这三个

高变区形成环连接,并且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密靠近地结合在一起,并且与来自另一条链的高变区一起,有助于形成抗体的抗原结合位点(参见例如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (第5版, 1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出多种效应子功能,例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC)。不同抗体之间的可变区在序列上存在很大不同。在具体的实施例中,可变区是人可变区。

[0076] 术语“根据Kabat的可变区残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变型是指上述Kabat等人中用于抗体汇编的重链可变区或轻链可变区的编号系统。使用这个编号系统,实际直链氨基酸序列可以含有对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入的更少的或另外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包含在残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)以及在残基82之后的三个插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。可以通过在抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。当提及可变结构域中的残基(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用kabat编号系统(例如,上述Kabat等人)。当提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,上述Kabat等人报道的EU索引)。“Kabat中的EU索引”是指人IgG 1EU抗体的残基编号。其他编号系统已例如由AbM、Chothia、Contact、IMGT和AHon描述。

[0077] 当用于提及抗体时,术语“重链”是指约50-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约120至130或更多个氨基酸的可变区,羧基末端部分包括恒定区。基于重链恒定区的氨基酸序列,恒定区可以是被称为阿尔法(α)、德尔塔(δ)、艾普斯龙(ϵ)、伽马(γ)和缪(μ)的五种不同类型(例如同种型)中的一种。不同的重链大小不同: α 、 δ 和 γ 含有约450个氨基酸,而 μ 和 ϵ 含有约550个氨基酸。当与轻链组合时,这些不同类型的重链分别产生五个熟知类别(例如同种型)的抗体,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包括IgG的四个亚类,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0078] 当用于提及抗体时,术语“轻链”是指约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约100至约110或更多个氨基酸的可变区,羧基末端部分包括恒定区。轻链的大致长度为211至217个氨基酸。基于恒定结构域的氨基酸序列,存在两种不同类型,称为卡帕(κ)或兰布达(λ)。

[0079] 如本文所用,术语“高变区”、“HVR”、“互补决定区”和“CDR”可互换使用。“CDR”是指免疫球蛋白(Ig或抗体)VH β -折叠框架的非框架区内的三个高变区(H1、H2或H3)之一,或抗体VL β -折叠框架的非框架区内的三个高变区(L1、L2或L3)之一。VH结构域中的CDR1、CDR2和CDR3也分别称为HCDR1、HCDR2和HCDR3。VL结构域中的CDR1、CDR2和CDR3也分别称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。因此,CDR是散布在框架区序列内的可变区序列。

[0080] CDR区是本领域技术人员熟知的,并且由熟知的编号系统定义。例如,kabat互补决定区(CDR)基于序列可变性并且是最常用的(参见例如上述Kabat等人;Nick Deschacht等人, *J Immunol* 2010;184:5696-5704)。Chothia代之以指结构环的位置(参见例如Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-17 (1987))。当使用Kabat编号规则编号时,Chothia CDR-H1环的末端在H32与H34之间变化,这取决于环的长度(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B处;如果35A和35B都不存在,则环在32处结束;如果只有35A存在,则环在33处结

束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。AbM高变区代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折中,并且被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用(参见例如Antibody Engineering第2卷(Kontermann和Dübel编辑,第2版,2010))。“接触”高变区基于对可用复杂晶体结构的分析。已经开发并广泛采用的另一种通用编号系统是ImMunoGeneTics (IMGT) Information System[®] (Lafranc等人,Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77(2003))。IMGT是专门研究人和其他脊椎动物的免疫球蛋白(IG)、T细胞受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHC)的综合信息系统。在本文中,CDR是指轻链或重链内的氨基酸序列和位置。由于CDR在免疫球蛋白可变结构域的结构内的“位置”在物种之间是保守的并且存在于称为环的结构中,通过使用根据结构特征比对可变结构域序列的编号系统,很容易识别CDR和框架残基。该信息可用于将来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基移植和替换到通常来自人抗体的接受者框架中。Honegger和Plückthun,J.Mol.Biol.309:657-70(2001)开发了另外的编号系统(AHon)。包括例如Kabat编号和IMGT独特编号系统在内的编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的(参见例如上述Kabat;上述Chothia和Lesk;上述Martin;上述Lefranc等人)。来自这些高变区或CDR中的每一个的残基在下表1中举例说明。

表1. 根据各种编号系统的示例性CDR

环	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 或 L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 或	L46--L55	L56--L65
			L50--L56		
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 或 L89--L97	L89--L96	L105-L117
CDR H1	H31--H35B (Kabat 编号)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (Chothia 编号)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 或 H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 或 H95--H102	H93--H101	H105-H117

[0081] 给定CDR的边界可以根据用于识别的方案而有所不同。因此,除非另有说明,否则术语给定抗体或其区(诸如可变区)的“CDR”和“互补决定区”以及抗体或其区的各个CDR(例如CDR-H1、CDR-H2)应理解为涵盖如上文所述的任何已知方案所定义的互补决定区。在一些情况下,指定用于识别一个或多个特定CDR的方案,例如通过IMGT、Kabat、Chothia或Contact方法定义的CDR。在其他情况下,给出了CDR的特定氨基酸序列。应当注意的是,CDR区也可以通过各种编号系统的组合来定义,例如Kabat和Chothia编号系统的组合,或Kabat和IMGT编号系统的组合。因此,术语诸如“如特定VH中阐述的CDR1”包括由上述示例性CDR编

号系统定义的任何CDR1,但不限于此。一旦给出可变区(例如,VH或VL),本领域技术人员将理解该区内的CDR可以通过不同的编号系统或其组合来定义。

[0082] 高变区可包括如下“扩展的高变区”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)以及89-97或89-96(L3),以及VH中的26-35或26-35A(H1)、50-65或49-65(H2)以及93-102、94-102或95-102(H3)。

[0083] 术语“恒定区”或“恒定结构域”是指轻链和重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应子功能,例如与Fc受体的相互作用。该术语是指免疫球蛋白分子的一部分,该免疫球蛋白分子的一部分相对于免疫球蛋白的另一部分,即可变区,具有更保守的氨基酸序列,该氨基酸序列含有抗原结合位点。恒定区可以含有重链的CH1、CH2和CH3区以及轻链的CL区。

[0084] 术语“框架”或“FR”是指那些位于CDR两侧的可变区残基。FR残基存在于例如嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、结构域抗体、双抗体、线性抗体和双特异性抗体中。FR残基是高变区残基或CDR残基之外的那些可变结构域残基。

[0085] 本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区,包括例如天然序列Fc区、重组Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从Cys226或Pro230位置的氨基酸残基延伸到其羧基末端。Fc区的C-末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可以被去除,例如,在抗体的生产或纯化期间,或通过重组工程化编码抗体重链的核酸。因此,完整抗体的组合物可以包含去除了所有K447残基的抗体群、没有去除K447残基的抗体群以及具有含和不含K447残基的抗体的混合物的抗体群。“功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括C1q结合、CDC、Fc受体结合、ADCC、吞噬作用、细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调等。此类效应子功能通常需要将Fc区与结合区或结合结构域(例如,抗体可变区或结构域)组合,并且可以使用本领域技术人员已知的各种测定法来评估。“变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰(例如取代、添加或缺失)而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列。在某些实施例中,变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如,在天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中约一至约十个氨基酸取代,或约一至约五个氨基酸取代。本文的变体Fc区可以具有与天然序列Fc区和/或亲本多肽的Fc区至少约80%的同源性,或与其至少约90%的同源性,例如与其至少约95%的同源性。

[0086] 如本文所用,“表位”是本领域中的术语,并且是指结合分子(例如抗体)可以特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是线性表位或构象、非线性或不连续表位。在多肽抗原的情况下,例如,表位可以是多肽的连续氨基酸(“线性”表位),或者表位可以包含来自多肽的两个或更多个非连续区域的氨基酸(“构象”、“非线性”或“不连续”表位)。本领域技术人员将理解,一般来讲,线性表位可以依赖于或不依赖于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施例中,结合分子与一组氨基酸结合,而不管它们是否折叠成天然三维蛋白结构。在其他实施例中,结合分子需要构成表位的氨基酸残基以表现出特定构象(例如弯曲、扭曲、转弯或折叠)以识别和结合表位。

[0087] 关于肽、多肽或抗体序列的“百分比(%)序列同一性”及“同源性”定义为在比对序列及必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比后且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分下,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百

分比。可根据所属领域技能内的多种方式,使用公众可获得的计算器软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件,实现比对,以确定氨基酸序列同一性百分比。所属领域技术人员可确定用于量测比对的适当参数,包括实现所比较的全长序列上的最大比对所需的任何算法。

[0088] 术语“特异性”是指抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)对抗原特定表位的选择性识别。例如,天然抗体是单特异性的。如本文所用,术语“多特异性”表示抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)具有两个或更多个抗原结合位点,其中至少两个结合不同的抗原。如本文所用,“双特异性”表示抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)具有两种不同的抗原结合特异性。如本文所用,术语“单特异性”CAR表示具有一个或多个结合位点的抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体),每个结合位点结合相同的抗原。

[0089] 如本文所用,术语“价”表示抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)中存在指定数目的结合位点。例如,天然抗体或全长抗体具有两个结合位点并且是二价的。如此,术语“三价”、“四价”、“五价”和“六价”分别表示抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)中存在两个结合位点、三个结合位点、四个结合位点、五个结合位点和六个结合位点。

[0090] 如本文所用,“嵌合抗原受体”或“CAR”是指可用于将一种或多种抗原特异性移植到免疫效应细胞诸如T细胞上的基因工程化受体。一些CAR也被称为“人工T细胞受体”、“嵌合T细胞受体”或“嵌合免疫受体”。在一些实施例中,CAR包含对一种或多种抗原(诸如肿瘤抗原)特异的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和T细胞和/或其他受体的细胞内信号传导结构域。“CAR-T细胞”是指表达CAR的T细胞。

[0091] 术语“多肽”和“肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,并且是指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链或支链的,它可以包含修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。该术语还涵盖已经天然或通过干预例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰而修饰的氨基酸聚合物。该定义还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物的多肽,包括但不限于非天然氨基酸,以及本领域已知的其他修饰。应当理解,由于本披露的多肽可以基于抗体或免疫球蛋白超家族的其他成员,因此在某些实施例中,“多肽”可以作为单链或作为两条或更多条相关链存在。

[0092] 如在本文中可互换使用的,“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基,和/或它们的类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸,诸如甲基化的核苷酸及其类似物。如本文所用,“寡核苷酸”是指短的、通常单链的、合成的多核苷酸,其长度通常(但不一定)小于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不互相排斥。上文关于多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。产生本披露的结合分子的细胞可以包括亲本杂交瘤细胞,以及已经将编码抗体的核酸引入其中的细菌和真核宿主细胞。除非另有说明,否则本文披露的任何单链多核苷酸序列的左侧末端是5'末端;双链多核苷酸序列的左手方向称为5'方向。新生RNA转录物的5'至3'添加的方向称为转录方向;DNA链上具有与RNA转录物相同序列的在RNA转录物的5'至5'末端的序列区域称为“上游序列”;DNA链上具有与RNA转录物相同序列的在RNA转录物的3'至3'末端的序列区域称为“下游序列”。

[0093] “分离的核酸”是这样的核酸(例如RNA、DNA或混合核酸):其基本上与天然伴随天

然序列的其他基因组DNA序列以及蛋白或复合物诸如核糖体和聚合酶分离。“分离的”核酸分子是与存在于核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。此外，“分离的”核酸分子，诸如cDNA分子，当通过重组技术产生时，可以基本上不含其他细胞物质或培养基，或者当化学合成时，基本上不含化学前体或其他化学物质。在具体的实施例中，一种或多种编码本文所述抗体的核酸分子被分离或纯化。该术语包括已从其天然存在的环境中去除的核酸序列，并且包括重组或克隆的DNA分离物和化学合成的类似物或由异源系统生物合成的类似物。基本上纯的分子可以包括该分子的分离形式。具体地，本文所述的编码CAR或抗体的“分离的”核酸分子是从至少一种污染物核酸分子鉴定和分离的核酸分子，该核酸分子通常在其产生的环境中与该至少一种污染物核酸分子缔合。

[0094] 除非另外说明，否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此呈简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白或RNA的核苷酸序列还可以包含内含子，其程度为编码该蛋白的核苷酸序列可以在某些形式中含有一个或多个内含子。

[0095] 术语“控制序列”是指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。适用于原核生物的控制序列例如包括启动子、任选的操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0096] 如本文所用，术语“可操作地连接的”和类似短语（例如，基因融合的），当用于指核酸或氨基酸时，分别是指核酸序列或氨基酸序列的可操作连接，它们彼此处于功能关系。例如，可操作地连接的启动子、增强子元件、开放阅读框，5'和3'UTR和终止子序列导致核酸分子（例如RNA）的准确产生。在一些实施例中，可操作地连接的核酸元件导致开放阅读框的转录并最终导致多肽的产生（即，开放阅读框的表达）。作为另一个实例，可操作地连接的肽是其中功能结构域以适当距离彼此放置以赋予每个结构域的预期功能的肽。

[0097] 术语“载体”是指用于携带或包括核酸序列的物质，该核酸序列包括例如编码如本文所述的结合分子（例如抗体）的核酸序列，以便将核酸序列引入宿主细胞。适用的载体包括，例如表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体，其可以包括选择序列或可稳定整合入宿主细胞染色体的标记。此外，载体可以包括一种或多种选择性标记基因和适当的表达控制序列。可以被包括的选择性标记基因例如提供对抗生素或毒素的抗性、补充营养缺陷或供应培养基中没有的关键营养素。表达控制序列可以包括本领域熟知的组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当两个或更多个核酸分子待共表达时（例如抗体重链和轻链或抗体VH和VL），可以将两个核酸分子插入，例如，单个表达载体或单独的表达载体中。对于单个载体表达，可以将编码核酸可操作地连接至一个共同的表达控制序列或连接至不同的表达控制序列，如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可以使用本领域熟知的方法来确认将核酸分子引入宿主细胞。这些方法包括例如核酸分析，诸如mRNA的Northern印迹或聚合酶链式反应（PCR）扩增、用于基因产物表达的免疫印迹或测试引入的核酸序列或其相应基因产物表达的其他合适的分析方法。本领域技术人员应理解，核酸分子以足以产生所需产物的量表达，并且应进一步理解，可以使用本领域熟知的方法来优化表达水平以获得充分表达。

[0098] 如本文所用，术语“宿主”是指动物，诸如哺乳动物（例如，人）。

[0099] 如本文所用，术语“宿主细胞”是指可以用核酸分子转染的特定目标细胞以及这种细胞的后代或潜在后代。由于在后续世代中可能发生的突变或环境影响或核酸分子整合到

宿主细胞基因组中,这种细胞的后代可能与用核酸分子转染的亲本细胞不相同。

[0100] 如本文所用,术语“自体的”意在指源自同一个体的任何材料,其中该材料随后被重新引入该个体。

[0101] “同种异体的”是指源自相同物种的不同个体的移植物。

[0102] 如本文所用,术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已使用外源核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代目标细胞及其子代。

[0103] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的监管机构批准,或在美国药典、欧洲药典或其他公认的药典中列出用于动物,并且更具体地用于人。

[0104] “赋形剂”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或封装材料。赋形剂包括例如封装材料或添加剂,诸如吸收促进剂、抗氧化剂、粘合剂、缓冲液、载剂、包衣剂、着色剂、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、调味剂、湿润剂、润滑剂、香料、防腐剂、推进剂、释放剂、灭菌剂、甜味剂、增溶剂、润湿剂以及它们的混合物。术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全或不完全))或媒介物。

[0105] 在一些实施例中,赋形剂是药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂的实例包括缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如,少于约10个氨基酸残基)多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和PLURONICSTM。药学上可接受的赋形剂的其他实例在Remington和Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版,1990)中进行了描述。

[0106] 在一个实施例中,每种组分在与药物制品的其他成分相容的意义上是“药学上可接受的”,并且适用于与人和动物的组织或器官接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。参见例如Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第6版; Rowe 等人编辑; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 第3版; Ash和Ash编辑; Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 第2版; Gibson编辑; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009。在一些实施例中,药学上可接受的赋形剂在所采用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。在一些实施例中,药学上可接受的赋形剂是水性pH缓冲溶液。

[0107] 在一些实施例中,赋形剂是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用组合物(例如,药物组合物)时,水是示例性赋形剂。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体赋形剂,特别是用于可注射溶液。赋形剂还可以包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,该组合物还可以含有少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可以采取溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制品等形式。口服组合物,包括配

制品,可以包括标准赋形剂,诸如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0108] 包括药物化合物的组合物可以含有例如分离或纯化形式的结合分子(例如抗体)以及适量的赋形剂。

[0109] 如本文所用,术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以产生所需结果的抗体或包含药剂和本文提供的抗体或药物组合物的治疗分子的量。

[0110] 术语“受试者”和“患者”可互换使用。如本文所用,在某些实施例中,受试者是哺乳动物,诸如非灵长类动物或灵长类动物(例如人)。在具体的实施例中,受试者是人。在一个实施例中,受试者是被诊断患有疾病或病症的哺乳动物,例如人。在另一个实施例中,受试者是处于发展疾病或病症的风险中的哺乳动物,例如人。

[0111] “施用”是指将存在于体外的物质注射或以其他方式物理递送到患者体内的行为,例如通过粘膜、皮内、静脉内、肌肉递送和/或本文所述或本领域已知的任何其他物理递送方法。

[0112] 如本文所用,术语“治疗”是指减少或改善由施用一种或多种疗法引起的疾病或病状的进展、严重性和/或持续时间。治疗可以通过评估与潜在病症相关的一种或多种症状是否已经减少、缓解和/或减轻来确定,使得观察到患者的改善,尽管患者可能仍然患有潜在病症。术语“治疗”包括控制和改善疾病。术语“控制”是指受试者从不一定导致疾病治愈的疗法中获得的有益效果。

[0113] 术语“预防”是指降低疾病、病症、病状或相关症状(例如糖尿病或癌症)发作(或复发)的可能性。

[0114] 如本文所用,“延迟”癌症的发展是指推迟、阻碍、减缓、减慢、稳定和/或延缓疾病的发展。该延迟可以具有不同的时间长度,其取决于疾病的历史和/或被治疗的个体。对本领域技术人员显而易见的是,足够的或显著的延迟实际上可以包括预防,因为该个体没有患上该疾病。与不使用该方法相比,“延迟”癌症的发展的方法是在给定的时间范围内降低疾病发展的可能性和/或在给定的时间范围内降低疾病程度的方法。此类比较通常基于使用统计学上显著数量的个体进行的临床研究。可以使用标准方法来检测癌症发展,这些标准方法包括但不限于计算机化轴向断层成像(CAT扫描)、磁共振成像(MRI)、腹部超声、凝血试验、动脉造影术或活检。发展也可以指最初可能无法检测到的癌症进展,并且包括发生、复发和发作。

[0115] 如本文所用,“GPC3相关疾病或病症”是指包含其中表达或过表达GPC3的细胞或组织的疾病或病症。在一些实施例中,GPC3相关疾病或病症包括其上异常表达GPC3的细胞。在其他实施例中,GPC3相关疾病或病症包括其中或其上GPC3的至少一种活性缺陷的细胞。

[0116] 术语“约”和“大约”是指在给定值或范围的20%内、15%内、10%内、9%内、8%内、7%内、6%内、5%内、4%内、3%内、2%内、1%内或更少。

[0117] 如在本披露和权利要求中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数形式,除非上下文另外清楚地指明。

[0118] 应当理解,在本文中任何地方用术语“包含”描述实施例,也提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的类似实施例。还应当理解,在本文中任何地方用短语“基本上由……组成”描述实施例,也提供了以“由……组成”描述的类似实施例。

[0119] 在短语“在A和B之间”或“在A-B之间”中使用的术语“在…之间”是指包括A和B的范围。

[0120] 如本文中在短语诸如“A和/或B”中使用的术语“和/或”旨在包括A和B;A或B;A(单独);和B(单独)。同样,在短语诸如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下实施例中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

5.2.GPC3结合分子

5.2.1.结合GPC3的抗体

[0121] 在一方面,本文提供了能够结合磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)的抗体。GPC3是通过糖基磷脂酰肌醇锚附着于细胞表面的硫酸乙酰肝素(HS)蛋白聚糖的磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族的成员(Filmus和Selleck, J Clin Invest 108:497-501, 2001)。GPC3基因编码大约70kD的核心蛋白,该核心蛋白可被弗林蛋白酶切割产生N-末端40kD片段和C-末端30kD片段。两条HS链连接在GPC3的C-末端部分上。GPC3和其他磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族蛋白在细胞分裂和细胞生长调控中发挥作用。GPC3在HCC和一些其他人类癌症(包括黑色素瘤、肺鳞状细胞癌和卵巢透明细胞癌)中高度表达(Ho和Kim, Eur J Cancer 47(3):333-338, 2011),但在正常组织中不表达。GPC3也称为SGB、DGSX、MXR7、SDYS、SGBS、OCI-5、SGBS1和GTR2-2。存在四种已知的人GPC3同种型(同种型1-4)。GPC3的四种同种型的核酸和氨基酸序列是已知的,包括GenBank登录号:NM_001164617和NP_001158089(同种型1);NM_004484和NP_004475(同种型2);NM_001164618和NP_001158090(同种型3);以及NM_001164619和NP_001158091(同种型4)。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体可以结合上述四种同种型中的任一种。在一些实施例中,本文提供的抗体结合人GPC3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体调节一种或多种GPC3活性。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体是拮抗剂抗体。

[0122] 在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体以 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_D)结合GPC3(例如人GPC3)。测量结合亲和力的多种方法是本领域已知的,其中任一种方法都可用于本披露的目的,包括通过RIA,例如,用目的抗体的Fab形式及其抗原进行(Chen等人, 1999, J. Mol Biol 293:865-81);通过生物层干涉测量法(BLI)或表面等离子体共振(SPR)测定法,通过Octet®,使用例如Octet® Red96系统,或通过Biacore®,使用例如Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000。“缔合速率”或“kon”也可以用上述相同的生物层干涉测量法(BLI)或表面等离子体共振(SPR)技术,使用例如Octet® Red96、Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000系统来测定。

[0123] 在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体是下文第6部分中描述的那些。因此,在一些实施例中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:61-80和117-125中任一个的一个或多个CDR序列。CDR序列可以根据熟知的编号系统来确定。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其他实施例中,CDR根据Chothia编号。在其他实施例中,CDR根据Contact编号。在一些实施例中,抗GPC3抗体是人源化的。在一些实施例中,抗GPC3抗体包含接受者人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0124] 在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:61中所示的HCDR1、

HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:62中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:63中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:64中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:65中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:66中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:67中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:68中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:69中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:70中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:117中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:118中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:119中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:120中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:121中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:122中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统或它们的组合来确定。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其他实施例中,CDR根据Chothia编号。在其他实施例中,CDR根据Contact编号。

[0125] 在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:71中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:72中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:73中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:74中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:75中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:76中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:77中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:78中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:79中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:80中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:123中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:124中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施例中,本文提供的抗GPC3抗体包含如SEQ ID NO:125中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。CDR序列可以根据熟知的编号系统或它们的组合来确定。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其他实施例中,CDR根据Chothia编号。在其他实施例中,CDR根据Contact编号。

[0126] 在一些实施例中,提供了包含如SEQ ID NO:61中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及如SEQ ID NO:71中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗体。在一些实施例中,提供了包含如SEQ ID NO:62中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及如SEQ ID NO:72中所示的LCDR1、LCDR2和

体。在一些实施例中,提供了包含如SEQ ID NO:122中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3以及如SEQ ID NO:125中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗体。CDR序列可以根据熟知的编号系统或它们的组合来确定。在一些实施例中,CDR根据IMGT编号。在一些实施例中,CDR根据Kabat编号。

在一些实施例中,CDR根据AbM编号。在其他实施例中,CDR根据Chothia编号。在其他实施例中,CDR根据Contact编号。

[0127] 在其他实施例中,本文提供了结合GPC3的抗体,该抗体包含(i)包含与SEQ ID NO:1-10中的任一个具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的HCDR1;(ii)包含与SEQ ID NO:11-20中的任一个具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的HCDR2;(iii)包含与SEQ ID NO:21-30中的任一个具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的HCDR3;(iv)包含与SEQ ID NO:31-40中的任一个具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的LCDR1;(v)包含与SEQ ID NO:41-50中的任一个具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的LCDR2;和/或(vi)包含与SEQ ID NO:51-60中的任一个具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%序列同一性的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施例中,抗GPC3抗体是人源化的。在一些实施例中,抗GPC3抗体包含接受者人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0128] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的LCDR3。

[0129] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的LCDR3。

[0130] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的LCDR3。

[0131] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的LCDR3。

[0132] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:

5的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的LCDR3。

[0133] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的LCDR3。

[0134] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的LCDR3。

[0135] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的LCDR3。

[0136] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的LCDR3。

[0137] 在一些更具体的实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCDR1、含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HCDR2和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR3,以及含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LCDR1、含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的LCDR2和含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的LCDR3。

[0138] 在一些实施例中,抗体进一步包含SEQ ID NO:61-80和117-125的一个或多个框架区。在一些实施例中,本文提供的抗体是人源化抗体。在一些实施例中,人源化抗体可以使用下文第6部分中例证的方法或下文部分中描述的方法产生。本文所述的框架区是根据CDR编号系统的边界确定的。换句话说,如果CDR由例如Kabat、IMGT或Chothia确定,则框架区是可变区中从N-末端到C-末端的形式的围绕CDR的氨基酸残基:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。例如,FR1被定义为如由例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的CDR1氨基酸残基的N-末端的氨基酸残基,FR2被定义为如由例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的CDR1与CDR2氨基酸残基之间的氨基酸残基,FR3被定义为如由例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的CDR2与CDR3氨基酸残基之间的氨基酸残基,并且FR4被定义为如由例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的CDR3氨基酸残基的C-末端的氨基酸残基。

[0139] 在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:61的VH结构域和含有SEQ ID NO:71的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:62的VH结构域和含有SEQ ID NO:72的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:63的VH结构域和含有SEQ ID NO:73的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:64的VH

结构域和含有SEQ ID NO:74的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:65的VH结构域和含有SEQ ID NO:75的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:66的VH结构域和含有SEQ ID NO:76的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:67的VH结构域和含有SEQ ID NO:77的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:68的VH结构域和含有SEQ ID NO:78的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:69的VH结构域和含有SEQ ID NO:79的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:70的VH结构域和含有SEQ ID NO:80的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域。在一些实施例中,抗体是scFv。

[0140] 在某些实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含相对于本文提供的任何抗体具有一定百分比同一性的氨基酸序列,例如下文第6部分中描述的那些。

[0141] 可以使用数学算法来确定两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的百分比同一性。用于比较两个序列的数学算法的非限制性实例是Karlin和Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:2264-2268(1990)的算法,修改为Karlin和Altschul,

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:5873 5877 (1993)。这种算法被合并到Altschul等人, J.Mol.Biol.215:403 (1990)的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如,对于评分=100,字长=12,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白搜索可以用XBLAST程序参数集进行,例如,对于评分50,字长=3,以获得与本文所述的蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的缺口比对,可以使用如Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389 3402 (1997)中所述的Gapped BLAST。替代性地,PSI BLAST可用于进行检测分子间距离关系的迭代搜索(Id.)。当使用BLAST、Gapped BLAST和PSI Blast程序时,可以使用(例如,XBLAST和NBLAST的)相应程序的默认参数(参见例如万维网上的美国国家生物技术信息中心(NCBI),ncbi.nlm.nih.gov)。用于序列比较的数学算法的另一个非限制性实例是Myers和Miller,CABIOS 4:11-17 (1998)的算法。这种算法被合并到ALIGN程序(2.0版)中,该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120重量残基表,缺口长度罚分为12,缺口罚分为4。在允许或不允许缺口的情况下,可以使用与上述技术类似的技术来确定两个序列之间的百分比同一性。在计算百分比同一性时,通常只计算完全匹配。

[0142] 在一些实施例中,本文提供的抗体含有相对于参考序列的取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗GPC3抗体保留结合GPC3的能力。在一些实施例中,在参考氨基酸序列中总共有1至10个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在一些实施例中,取代、插入或缺失发生在CDR以外的区域(即FR中)。任选地,本文提供的抗GPC3抗体包括参考序列的翻译后修饰。

[0143] 在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:61的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VH结构域和与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VL结构域,其中抗体结合GPC3。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VH结构域和与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VL结构域,其中抗体结合GPC3。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VH结构域和与SEQ ID NO:73的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VL结构域,其中抗体结合GPC3。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VH结构域和与SEQ ID NO:74的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至

99%序列同一性的VL结构域,其中抗体结合GPC3。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:121的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VH结构域和与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VL结构域,其中抗体结合GPC3。在一些实施例中,本文提供的抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:122的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VH结构域和与SEQ ID NO:125的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VL结构域,其中抗体结合GPC3。在一些实施例中,抗体是scFv。

[0144] 在一些实施例中,可以例如通过组合丙氨酸扫描对功能性表位进行作图,以鉴定GPC3蛋白中与本文提供的抗GPC3抗体相互作用所必需的氨基酸。在一些实施例中,可以使用结合GPC3的抗GPC3抗体的构象和晶体结构来鉴定表位。在一些实施例中,本披露提供了与本文提供的任何抗GPC3抗体特异性结合相同表位的抗体。例如,在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:61的VH结构域和含有SEQ ID NO:71的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:62的VH结构域和含有SEQ ID NO:72的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:63的VH结构域和含有SEQ ID NO:73的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:64的VH结构域和含有SEQ ID NO:74的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:65的VH结构域和含有SEQ ID NO:75的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:66的VH结构域和含有SEQ ID NO:76的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:67的VH结构域和含有SEQ ID NO:77的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:68的VH结构域和含有SEQ ID NO:78的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:69的VH结构域和含有SEQ ID NO:79的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:70的VH结构域和含有SEQ ID NO:80的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗

GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体结合相同表位的抗体。在一些实施例中,抗体是scFv。

[0145] 在一些实施例中,本文提供了与本文所述的任一种抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗GPC3抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:61的VH结构域和含有SEQ ID NO:71的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:62的VH结构域和含有SEQ ID NO:72的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:63的VH结构域和含有SEQ ID NO:73的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:64的VH结构域和含有SEQ ID NO:74的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:65的VH结构域和含有SEQ ID NO:75的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:66的VH结构域和含有SEQ ID NO:76的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:67的VH结构域和含有SEQ ID NO:77的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:68的VH结构域和含有SEQ ID NO:78的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:69的VH结构域和含有SEQ ID NO:79的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:70的VH结构域和含有SEQ ID NO:80的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID

NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:123的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:124的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:117的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:118的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:119的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:120的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:121的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,提供了与包含含有SEQ ID NO:122的VH结构域和含有SEQ ID NO:125的VL结构域的抗GPC3抗体竞争性地特异性结合GPC3的抗体。在一些实施例中,抗体是scFv。

[0146] 在一些实施例中,本文提供了包含上述抗GPC3抗体中的任一种的GPC3结合蛋白。在一些实施例中,GPC3结合蛋白是单克隆抗体,包括小鼠、嵌合、人源化或人抗体。在一些实施例中,抗GPC3抗体是抗体片段,例如scFv。在一些实施例中,GPC3结合蛋白是包含本文提供的抗GPC3抗体的融合蛋白。在其他实施例中,GPC3结合蛋白是包含本文提供的抗GPC3抗体的多特异性抗体。其他示例性GPC3结合分子在以下部分中更详细地描述。

[0147] 在一些实施例中,根据任何上述实施例的抗GPC3抗体或抗原结合蛋白可以单独或组合地结合任何特征,如下文第5.2.2至5.2.8部分中所述的。

5.2.2. 抗体片段

[0148] 如本文所用,术语“抗体”还包括其各种抗体片段。本文提供的抗体包括但不限于免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分。本文提供的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何亚类(例如IgG1、IgG2、

IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。在一些实施例中，抗体是IgG抗体。在一些实施例中，IgG抗体是IgG1抗体。在一些实施例中，IgG抗体是IgG2、IgG3或IgG4抗体。

[0149] 抗体的变体和衍生物包括保留与抗原结合能力的抗体功能片段。示例性功能片段包括Fab片段(例如，含有抗原结合结构域并包含通过二硫键桥接的轻链和部分重链的抗体片段)；Fab' (例如，含有单个抗原结合结构域的抗体片段，该抗原结合结构域包含Fab和通过铰链区的重链的附加部分)；F(ab')₂ (例如，通过重链的铰链区中的链间二硫键连接的两个Fab' 分子；这两个Fab' 分子可以针对相同或不同的表位)；双特异性Fab (例如，具有两个抗原结合结构域的Fab分子，每个抗原结合结构域可以针对不同的表位)；包含可变区的单链，也称为scFv (例如，通过例如10-25个氨基酸的链连接在一起的抗体的单条轻链和重链的可变抗原结合决定区)；二硫键连接的Fv或dsFv (例如，通过二硫键连接在一起的抗体的单条轻链和重链的可变抗原结合决定区)；骆驼化VH (例如，抗体的单条重链的可变抗原结合决定区，其中VH界面处的一些氨基酸是在天然存在的骆驼抗体的重链中发现的那些)；双特异性scFv (例如，具有两个抗原结合结构域的scFv或dsFv分子，每个抗原结合结构域可以针对不同的表位)；双抗体 (例如，当第一scFv的VH结构域与第二scFv的VL结构域组装并且第一scFv的VL结构域与第二scFv的VH结构域组装时形成的二聚化scFv；双抗体的两个抗原结合区可以针对相同或不同的表位)；三抗体 (例如，三聚化scFv，以类似于双抗体的方式形成，但其中在单个复合物中产生三个抗原结合结构域；三个抗原结合结构域可以针对相同或不同的表位)；以及四抗体 (例如，四聚化scFv，以类似于双抗体的方式形成，但其中在单个复合物中产生四个抗原结合结构域；四个抗原结合结构域可以针对相同或不同的表位)。

[0150] 已经开发了多种用于产生抗体片段的技术。传统上，这些片段是通过完整抗体的蛋白水解消化获得的(参见例如Morimoto等人，1992，*J. Biochem. Biophys. Methods* 24: 107-17；以及Brennan等人，1985，*Science* 229:81-83)。然而，这些片段现在可以直接由重组宿主细胞产生。例如，Fab、Fv和scFv抗体片段都可以在大肠杆菌或酵母细胞中表达并分泌，因此可以容易地产生大量这些片段。抗体片段可以从上述抗体噬菌体文库中分离。替代性地，Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收并化学偶联形成F(ab')₂片段(Carter等人，1992，*Bio/Technology* 10:163-67)。根据另一种方法，F(ab')₂片段可以直接从重组宿主细胞培养物中分离。包含补救受体结合表位残基的具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段描述于例如美国专利号5,869,046中。用于产生抗体片段的其他技术对本领域技术人员而言是显而易见的。在某些实施例中，抗体是单链Fv片段(scFv) (参见例如W0 93/16185；美国专利号5,571,894和5,587,458)。Fv和scFv具有无恒定区的完整结合位点；因此，它们可能适于在体内使用期间减少非特异性结合。可以构建scFv融合蛋白以在scFv的氨基或羧基末端产生效应蛋白的融合(参见例如上述Borrebaec编辑)。抗体片段也可以是“线性抗体”，例如，如上文引用的参考文献中所述。此类线性抗体可以是单特异性的或多特异性的，诸如双特异性的。

[0151] 在一些具体实施例中，本文提供的抗体是scFv，该scFv包含上述包括例如SEQ ID NO:61-70和117-122的VH结构域中的任一个，以及上述包括例如SEQ ID NO:71-80和123-125的VL结构域中的任一个。更具体地，在一些实施例中，本文提供了包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的scFv。在一些实施例中，本文提供了包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的scFv。在一些实施例中，本文提供了包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的scFv。在一些实施例中，本

[0153] 本文所述的抗体包括人源化抗体。人源化抗体,诸如本文披露的人源化抗体可以使用本领域已知的多种技术产生,包括但不限于CDR-移植(欧洲专利号EP239,400;国际专利号WO 91/09967;以及美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089)、镶面或表面重修(欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596;Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka等人, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994);以及Roguska等人, *PNAS* 91:969-973 (1994))、链改组(美国专利号5,565,332)和例如美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、WO 9317105、Tan等人, *J. Immunol.* 169:1119-1125 (2002)、Caldas等人, *Protein Eng.* 13(5):353-60 (2000)、Morea等人, *Methods* 20(3):267-79 (2000)、Baca等人, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84 (1997)、Roguska等人, *Protein Eng.* 9(10):895-904 (1996)、Couto等人, *Cancer Res.* 55(23Supp):5973s-5977s (1995)、Couto等人, *Cancer Res.* 55(8):1717-22 (1995)、Sandhu JS, *Gene* 150(2):409-10 (1994)和Pedersen等人 *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73 (1994)中披露的技术。还参见美国专利公开号US 2005/0042664 A1(2005年2月24日),其中每一个通过援引以其全文并入本文。

[0154] 在一些实施例中,本文提供的抗体可以是结合GPC3(包括人GPC3)的人源化抗体。例如,本披露的人源化单链抗体可以包含SEQ ID NO:61-80和117-125中所示的一种或多种CDR。用于人源化非人抗体的各种方法是本领域已知的。例如,人源化抗体可以具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基,这些残基典型地取自“输入”可变结构域。可以例如按照Jones等人, *Nature* 321:522-25 (1986)、Riechmann等人, *Nature* 332:323-27 (1988)和Verhoeyen等人, *Science* 239:1534-36 (1988)的方法,通过用高变区序列取代人抗体的相应序列来进行人源化。在一个具体实施例中,如下文第6部分中所述的进行本文提供的抗体的人源化。

[0155] 在一些情况下,人源化抗体通过CDR移植构建,其中亲本非人抗体的CDR的氨基酸序列被移植到人抗体框架上。例如,Padlan等人确定CDR中只有约三分之一的残基实际接触抗原,并将这些称为“特异性决定残基”或SDR(Padlan等人, *FASEB J.* 9:133-39 (1995))。在SDR移植技术中,仅SDR残基被移植到人抗体框架上(参见例如Kashmiri等人, *Methods* 36:25-34 (2005))。

[0156] 选择用于制备人源化抗体的人可变结构域对于降低抗原性可能很重要。例如,根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知的人可变结构域序列的整个文库筛选非人抗体的可变结构域的序列。可以选择最接近非人抗体的人序列作为人源化抗体的人框架(Sims等人, *J. Immunol.* 151:2296-308 (1993);以及Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196:901-17 (1987))。另一种方法使用源自轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-89 (1992);以及Presta等人, *J. Immunol.* 151:2623-32 (1993))。在一些情况下,框架源自最丰富的人亚类V_L6亚组I(V_L6I)和V_H亚组III(V_HIII)的共有序列。在另一种方法中,使用人种系基因作为框架区的来源。

[0157] 在基于CDR比较的替代范例中,称为超人源化,FR同源性是不相关的。该方法包括将非人序列与功能性人种系基因库进行比较。然后选择那些编码与鼠序列相同或密切相关的规范结构的基因。接下来,在与非人抗体共有规范结构的基因中,选择那些在CDR内具有最高同源性的基因作为FR供体。最后,将非人CDR移植到这些FR上(参见例如Tan等人,

J. Immunol. 169:1119-25 (2002))。

[0158] 通常还希望将抗体人源化以保留它们对抗原的亲力和其他有利的生物学性质。为了实现该目标,根据一种方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可获得的并且是本领域技术人员所熟悉的。可以获得说明和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序。这些包括例如WAM (Whitelegg和Rees, Protein Eng. 13:819-24 (2002))、Modeller (Sali和Blundell, J. Mol. Biol. 234:779-815 (1993)) 和Swiss PDB Viewer (Guex和Peitsch, Electrophoresis 18:2714-23 (1997))。检查这些显示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,例如分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可以从受体和输入序列中选择并组合FR残基,从而获得所需的抗体特征,诸如对一个或多个靶抗原的亲合力增加。通常,高变区残基直接且最显著地参与影响抗原结合。

[0159] 抗体人源化的另一种方法是基于称为Human String Content (HSC)的抗体人性度量。该方法将小鼠序列与人种系基因库进行比较,并将差异评分为HSC。然后通过最大化其HSC而不是使用全局同一性测量来将靶序列人源化以产生多种不同的人源化变体 (Lazar等人, Mol. Immunol. 44:1986-98 (2007))。

[0160] 除了上述方法之外,经验方法也可用于产生和选择人源化抗体。这些方法包括那些基于产生大型人源化变体文库和使用富集技术或高通量筛选技术选择最佳克隆的方法。抗体变体可以从噬菌体、核糖体和酵母展示文库以及通过细菌菌落筛选分离 (参见例如Hoogenboom, Nat. Biotechnol. 23:1105-16 (2005); Dufner等人, Trends Biotechnol. 24:523-29 (2006); Feldhaus等人, Nat. Biotechnol. 21:163-70 (2003); 以及Schlapschy等人, Protein Eng. Des. Sel. 17:847-60 (2004))。

[0161] 在FR文库方法中,在FR中的特定位置引入一批残基变体,然后筛选文库以选择最佳支持移植的CDR的FR。待取代的残基可以包括被鉴定为可能有助于CDR结构的“游标”残基中的一些或全部 (参见例如Foote和Winter, J. Mol. Biol. 224:487-99 (1992)), 或来自Baca等人J. Biol. Chem. 272:10678-84 (1997) 鉴定的更有限的一组靶残基。

[0162] 在FR改组中,整个FR与非人CDR组合而不是创建所选残基变体的组合文库 (参见例如Dall'Acqua等人, Methods 36:43-60 (2005))。可以使用一步FR改组过程。这种方法已被证明是有效的,因为所得抗体表现出改善的生物化学和物理化学性质,包括增强的表达、增加的亲和力和热稳定性 (参见例如Damschroder等人, Mol. Immunol. 44:3049-60 (2007))。

[0163] “人源化工程” (humaneering) 方法基于基本最小特异性决定簇 (MSD) 的实验鉴定,并基于将非人片段顺序替换到人FR文库中并评估结合。该方法通常导致表位保留和鉴定来自具有不同人V区段CDR的多个亚类的抗体。

[0164] “人工程化” (human engineering) 方法涉及通过对抗体的氨基酸序列进行特异性改变来改变非人抗体或抗体片段,从而产生在人中具有降低的免疫原性的经修饰的抗体,该经修饰的抗体仍然保留原始非人抗体的所需结合特性。通常,该技术涉及将非人抗体的氨基酸残基分类为“低风险”、“中等风险”或“高风险”残基。使用总体风险/回报计算进行分类,该计算评估进行特定取代 (例如,针对人的免疫原性) 的预测益处与取代将影响所得抗体折叠的风险。可以通过将来自非人抗体可变区的氨基酸序列与特定或共有人抗体序列的

相应区域进行比对来选择将在非人抗体序列的给定位置(例如,低风险或中等风险)处被取代的特定人氨基酸残基。非人序列中低风险或中等风险位置的氨基酸残基可以根据比对取代人抗体序列中的相应残基。Studnicka等人,Protein Engineering 7:805-14(1994)、美国专利号5,766,886、5,770,196、5,821,123和5,869,619以及PCT公开WO 93/11794中更详细地描述了用于制备人工程化蛋白的技术。

[0165] 可以使用例如Composite Human Antibody™技术(Antitope Ltd.,Cambridge, United Kingdom)产生复合人抗体。为了产生复合人抗体,以避免T细胞表位的方式从多个人抗体可变区序列的片段设计可变区序列,从而使所得抗体的免疫原性最小化。

[0166] 去免疫化抗体是其中T细胞表位已被去除的抗体。已经描述了制备去免疫化抗体的方法。参见例如Jones等人,Methods Mol Biol.525:405-23(2009),xiv和De Groot等人,Cell.Immunol.244:148-153(2006)。去免疫化抗体包含T细胞表位缺失的可变区和人恒定区。简言之,对抗体的可变区进行克隆,随后通过在T细胞增殖测定中测试源自抗体可变区的重叠肽来鉴定T细胞表位。通过计算机方法鉴定T细胞表位以鉴定与人MHC II类结合的肽。在可变区中引入突变以消除与人MHC II类的结合。然后使用突变的可变区来产生去免疫化抗体。

5.2.4. 抗体变体

[0167] 在一些实施例中,考虑了本文所述的结合GPC3的抗体的一个或多个氨基酸序列修饰。例如,可能需要优化抗体的结合亲和力和/或其他生物学性质,包括但不限于特异性、热稳定性、表达水平、效应子功能、糖基化、降低的免疫原性或溶解性。因此,除了本文所述的结合GPC3的抗体之外,预期还可以制备本文所述的结合GPC3的抗体的变体。例如,可以通过将适当的核苷酸变化引入编码DNA中和/或通过合成所需的抗体或多肽来制备抗体变体。本领域技术人员理解氨基酸改变可改变抗体的翻译后过程。

化学修饰

[0168] 在一些实施例中,本文提供的抗体是化学修饰的,例如,通过将任何类型的分子共价连接到抗体。抗体衍生物可以包括已经被化学修饰的抗体,例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配体或其他蛋白连接或与一个或多个免疫球蛋白结构域(例如Fc或Fc的一部分)缀合。可以通过已知技术进行多种化学修饰中的任一种,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、配制、衣霉素的代谢合成等。另外,抗体可以含有一种或多种非经典氨基酸。

[0169] 在一些实施例中,改变本文提供的抗体以增加或降低抗体糖基化的程度。通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点,可以方便地实现抗体糖基化位点的添加或缺失。

[0170] 当本文提供的抗体与Fc区融合时,可以改变与其连接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的双触角寡糖,该分支的双触角寡糖通常通过N键连接到Fc区的CH2结构域的Asn297。参见例如Wright等人TIBTECH15:26-32(1997)。寡糖可以包括多种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及在双触角寡糖结构的“茎”中与GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施例中,可以对本文提供的结合分子中的寡糖进行修饰以产生具有某些改善特性的变体。

[0171] 在其他实施例中,当本文提供的抗体与Fc区融合时,本文提供的抗体变体可具有

缺乏(直接或间接)连接到所述Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,这种抗体中岩藻糖的量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量通过计算相对于如通过MALDI-TOF质谱法测量的连接到Asn297的所有糖结构(例如,复合物、杂合体和高甘露糖结构)的总和,在Asn 297处的糖链内的岩藻糖的平均量来确定,如例如WO 2008/077546中描述的。Asn297是指位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可以位于位置297上游或下游约±3个氨基酸处,即在位置294与位置300之间。这种岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开号US 2003/0157108和US 2004/0093621。与“脱岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷”抗体变体相关的出版物的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生脱岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108和WO 2004/056312)和敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因、FUT8、敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);以及WO 2003/085107)。

[0172] 包含本文提供的抗体的结合分子还提供有等分寡糖,例如,其中连接到Fc区的双触角寡糖被GlcNAc等分。此类变体可具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)、美国专利号6,602,684(Umana等人)和US 2005/0123546(Umana等人)中。还提供了在连接到Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的变体。此类变体可具有改善的CDC功能。此类变体描述于例如WO 1997/30087、WO 1998/58964和WO 1999/22764中。

[0173] 在包含本发明抗体和Fc区的分子中,可以将一种或多种氨基酸修饰引入Fc区,从而产生Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),该序列包含在一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰(例如,取代)。

[0174] 在一些实施例中,本申请考虑了具有一些(但非全部)效应子功能的变体,这些功能使该抗体变体成为适合应用的理想候选物,在这些应用中,结合分子的体内半衰期很重要,但某些效应子功能(例如,补体和ADCC)是非必要或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定确保结合分子没有Fc γ R结合能力(因此可能缺乏ADCC活性),但可以保留FcRn结合能力。在美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))、Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985)以及5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中描述了用于评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例。替代性地,可以采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTITM非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc.Mountain View,CA;以及CytoTox96[®]非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison,WI)。用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代性

地或另外地,可以在体内评估目的分子的ADCC活性,例如在动物模型中,如Clynes等人, Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656 (1998) 中披露的。还可以进行C1q结合测定确认抗体不能结合C1q,并且因此缺乏CDC活性。参见例如在WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人, J.Immunol.Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S.等人, Blood 101:1045-1052 (2003); 以及Cragg, M.S.和M.J.Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova, S.B.等人, Int'l Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0175] 具有降低的效应子功能的结合分子包括取代Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的抗体(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括取代氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个的Fc突变体,包括残基265和297被丙氨酸取代的称为“DANA”的Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0176] 描述了与FcR结合提高或降低的某些变体。(参见,例如美国专利号6,737,056; WO 2004/056312, 以及Shields等人, J.Biol.Chem. 9 (2):6591-6604 (2001))。

[0177] 在一些实施例中,变体包含具有一个或多个氨基酸取代的Fc区,这些取代(例如, Fc区内的位置298、333和/或334处的取代(残基的EU编号))改善ADCC。在一些实施例中, Fc区内发生改变,导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)发生改变(即,提高或降低), 例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人, J.Immunol. 164:4178-4184 (2000) 中所描述。

[0178] 具有延长的半衰期和与新生儿Fc受体(FcRn)的结合改善的结合分子(其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人, J.Immunol. 117:587 (1976) 和Kim等人, J.Immunol. 24:249 (1994)) 描述于US2005/0014934A1中(Hinton等人)。那些分子包含具有一个或多个氨基酸取代的Fc区,其中这些取代改善了Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在一个或多个Fc区残基处具有取代的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如取代Fc区残基434(美国专利号7,371,826)。还参见Duncan&Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利号5,648,260; 美国专利号5,624,821; 以及关于Fc区变体的其他实例的WO 94/29351。

[0179] 在一些实施例中,可能需要产生半胱氨酸工程化抗体,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在一些实施例中,取代的残基发生在抗体的可接近位点。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位在抗体的可接近位点处,并且可用于将抗体缀合至其他部分,诸如药物部分或接头-药物部分,以产生免疫缀合物,如本文进一步描述的。

取代、缺失或插入

[0180] 变异可以是编码抗体或多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,导致与原始抗体或多肽相比氨基酸序列发生改变。取代诱变的目的位点包括CDR和FR。

[0181] 氨基酸取代可以用具有相似结构和/或化学性质的另一种氨基酸取代一种氨基酸的结果,诸如用丝氨酸取代亮氨酸,例如保守氨基酸取代。本领域技术人员已知的标准技术可用于在编码本文提供的分子的核苷酸序列中引入突变,包括例如导致氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。插入或缺失可任选地在约1至5个氨基酸的范围内。在某些实施例

中,取代、缺失或插入包括相对于原始分子的少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。在具体的实施例中,取代是在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行的保守氨基酸取代。所允许的变化可以通过在序列中系统地进行氨基酸的插入、缺失或取代并测试所得变体的亲本抗体表现出的活性来确定。

[0182] 氨基酸序列插入包括氨基末端和/或羧基末端融合,长度在一个残基至含有多个残基的多肽的范围内,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰残基的抗体。

[0183] 本披露内容包括通过保守氨基酸取代产生的抗体。在保守氨基酸取代中,氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基取代。如上所述,本领域已经定义了具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -支化侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。替代性地,可以沿着全部或部分编码序列随机引入突变,例如通过饱和诱变,并且可以筛选所得突变体的生物活性以鉴定保留活性的突变体。诱变后,可以表达编码的蛋白并且可以确定蛋白的活性。可以进行保守(例如,在具有相似性质和/或侧链的氨基酸组内)取代,以便保持或不显著改变性质。示例性取代示于下表2中。

表2. 氨基酸取代

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

[0184] 氨基酸可以根据它们的侧链的性质的相似性进行分组(参见例如Lehninger,

Biochemistry 73-75 (第2版, 1975)) : (1) 非极性: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M); (2) 不带电的极性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q); (3) 酸性: Asp (D)、Glu (E); 和 (4) 碱性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)。替代性地, 天然存在的残基可以根据共同的侧链性质进行分组: (1) 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性: Asp、Glu; (4) 碱性: His、Lys、Arg; (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro; 和 (6) 芳香性: Trp、Tyr、Phe。例如, 任何不参与维持抗体的正确构象的半胱氨酸残基也可以例如用另一种氨基酸诸如丙氨酸或丝氨酸取代, 以提高分子的氧化稳定性并防止异常交联。非保守取代将需要将这类别中的一个的成员交换为另一个类别。

[0185] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体 (例如, 人源化或人抗体) 的一个或多个高变区残基。通常, 选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体在某些生物学特性 (例如, 增加的亲和力、降低的免疫原性) 方面具有修饰 (例如, 改善) 和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟的抗体, 其可以方便地产生, 例如, 使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术, 诸如本文所述的那些。简而言之, 一个或多个CDR残基突变并且变体抗体在噬菌体上展示并针对特定的生物活性 (例如, 结合亲和力) 来筛选。

[0186] 可以在CDR中进行改变 (例如取代), 例如以提高抗体亲和力。可在CDR“热点”, 即由在体细胞成熟过程中经历高频突变的密码子编码的残基 (参见例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) 和/或SDR (a-CDR) 中进行此类改变, 其中测试所得变体抗体或其片段的结合亲和力。通过从二级文库中构建和重新选择的亲和力成熟描述于例如: Hoogenboom等人 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37中 (O'Brien等人编辑, Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施例中, 通过多种方法 (例如, 易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变) 中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选文库以鉴定具有所需的亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及CDR导向的方法, 其中将几个CDR残基 (例如, 一次4-6个残基) 随机化。可以特异性鉴定参与抗原结合的CDR残基, 例如, 使用丙氨酸扫描诱变或建模。以下部分提供了关于亲和力成熟的更详细描述。

[0187] 在一些实施例中, 取代、插入或缺失可以发生在一个或多个CDR内, 只要此类改变基本上不降低抗体结合抗原的能力。例如, 可以在CDR中进行不显著降低结合亲和力的保守改变 (例如, 如本文提供的保守取代)。在本文提供的变体抗体序列的一些实施例中, 每个CDR是未改变的或者含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0188] 如Cunningham和Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989) 所述, 用于鉴定可以靶向诱变的抗体的残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此方法中, 鉴定靶残基的残基或残基组 (例如, 带电荷的残基, 诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu), 并用中性或带负电荷的氨基酸 (例如, 丙氨酸或聚丙氨酸) 替换, 以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在氨基酸位置引入另外的取代, 证明对初始取代的功能敏感性。替代性地, 或另外地, 确定抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可以作为取代候选物而被靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的特性。

[0189] 氨基酸序列插入包括氨基末端和/或羧基末端融合, 长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内, 以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的

实例包括具有N-末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括将抗体的N-末端或C-末端与增加抗原结合结构域抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽融合。

[0190] 可以使用本领域已知的方法诸如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描和PCR诱变来进行变化。可以对克隆的DNA进行定点诱变(参见例如Carter, *Biochem J.* 237:1-7 (1986); 以及Zoller等人, *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500 (1982))、盒式诱变(参见例如Wells等人, *Gene* 34:315-23 (1985))或其他已知技术以产生抗体变体DNA。

5.2.5. 体外亲和力成熟

[0191] 在一些实施例中,与亲本抗体相比具有改善的性质诸如亲和力、稳定性或表达水平的抗体变体可以通过体外亲和力成熟来制备。与天然原型一样,体外亲和力成熟基于突变和选择的原理。抗体文库展示在生物体(例如噬菌体、细菌、酵母或哺乳动物细胞)的表面上或与其编码mRNA或DNA缔合(例如共价或非共价)。所展示抗体的亲和力选择允许分离携带编码抗体的遗传信息的生物体或复合物。使用展示方法诸如噬菌体展示的两轮或三轮突变和选择通常产生亲和力在低纳摩尔范围内的抗体片段。亲和力成熟的抗体可以对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。

[0192] 噬菌体展示是一种用于展示和选择抗体的普遍方法。抗体作为与噬菌体外壳蛋白的融合体展示在Fd或M13噬菌体的表面上。选择涉及暴露于抗原以允许噬菌体展示的抗体结合它们的靶标,该过程被称为“淘选”。与抗原结合的噬菌体被回收并用于感染细菌以产生噬菌体用于进一步的轮次选择。关于综述,参见例如Hoogenboom, *Methods. Mol. Biol.* 178:1-37 (2002); 以及Bradbury和Marks, *J. Immunol. Methods* 290:29-49 (2004)。

[0193] 在酵母展示系统中(参见例如Boder等人, *Nat. Biotech.* 15:553-57 (1997); 以及Chao等人, *Nat. Protocols* 1:755-68 (2006))中,抗体可以与酵母凝集素蛋白Aga2p的粘附亚基融合,该粘附亚基通过与Aga1p的二硫键连接到酵母细胞壁。通过Aga2p展示蛋白使蛋白从细胞表面突出,从而使与酵母细胞壁上其他分子的潜在相互作用最小化。磁性分离和流式细胞术用于筛选文库以选择具有改善的亲和力或稳定性的抗体。通过用生物素化抗原和与荧光团缀合的第二药剂诸如链霉亲和素标记酵母来测定与目的可溶性抗原的结合。可以通过免疫荧光标记位于单链抗体两侧的血凝素或c-Myc表位标签(例如scFv)来测量抗体表面表达的变化。已显示表达与所展示蛋白的稳定性相关,并且因此可以选择抗体以提高稳定性以及亲和力(参见例如Shusta等人, *J. Mol. Biol.* 292:949-56 (1999))。酵母展示的另一个优点是利用内质网伴侣蛋白和质量控制机制,展示的蛋白在真核酵母细胞的内质网中折叠。一旦成熟完成,抗体亲和力可以方便地“滴定”,同时展示在酵母表面上,从而消除表达和纯化每个克隆的需要。酵母表面展示的理论限制是比其他展示方法可能更小的功能库大小;然而,最近的方法使用酵母细胞的交配系统来产生大小估计为 10^{14} 的组合多样性(参见例如美国专利公开2003/0186374; 以及Blaise等人, *Gene* 342:211-18 (2004))。

[0194] 在核糖体展示中,产生抗体-核糖体-mRNA (ARM) 复合物用于在无细胞系统中选择。编码特定抗体文库的DNA文库与缺乏终止密码子的间隔区序列基因融合。该间隔区序列在翻译时仍然连接到肽基tRNA并占据核糖体通道,从而使目的蛋白从核糖体中突出并折叠。所得的mRNA、核糖体和蛋白的复合物可以与表面结合的配体结合,从而允许通过与配体的亲和捕获同时分离抗体及其编码mRNA。然后将核糖体结合的mRNA逆转录回cDNA,然后可以

进行诱变并用于下一轮选择(参见例如Fukuda等人,Nucleic Acids Res.34:e127(2006))。在mRNA展示中,使用嘌呤霉素作为衔接分子在抗体与mRNA之间建立共价键(Wilson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98:3750-55(2001))。

[0195] 由于这些方法完全在体外进行,因此它们提供了优于其他选择技术的两个主要优点。第一,文库的多样性不受细菌细胞转化效率的限制,而仅受试管中存在的核糖体和不同mRNA分子的数量限制。第二,在每一轮选择之后可以容易地引入随机突变,例如,通过非校对聚合酶,因为在任何多样化步骤之后都不必转化任何文库。

[0196] 在一些实施例中,可以使用哺乳动物展示系统。

[0197] 也可以按靶向方式或通过随机引入将多样性引入抗体文库的CDR中。前一种方法包括通过高水平或低水平的诱变顺序靶向抗体的所有CDR或靶向体细胞超突变的分离的热点(参见例如Ho等人,J.Biol.Chem.280:607-17(2005))或基于实验或结构原因怀疑影响亲和力的残基。也可以通过DNA改组或类似技术替换天然多样化的区域来引入多样性(参见例如Lu等人,J.Biol.Chem.278:43496-507(2003);美国专利号5,565,332和6,989,250)。替代技术靶向延伸到框架区残基中的高变环(参见例如Bond等人,J.Mol.Biol.348:699-709(2005)),在CDR中使用环缺失和插入或使用基于杂交的多样化(参见例如美国专利公开号2004/0005709)。在CDR中产生多样性的其他方法披露于例如美国专利号7,985,840中。可用于产生抗体文库和/或抗体亲和力成熟的其他方法披露于例如美国专利号8,685,897和8,603,930以及美国公开号2014/0170705、2014/0094392、2012/0028301、2011/0183855和2009/0075378中,其各自通过援引并入本文。

[0198] 文库的筛选可以通过本领域已知的各种技术完成。例如,抗体可以固定在固体支持物、柱、针或纤维素/聚(偏二氟乙烯)膜/其他滤膜上,在附着于吸附板的宿主细胞上表达或用于细胞分选,或与生物素缀合以用链霉亲和素包被的珠捕获,或用于任何其他方法以淘选展示文库。

[0199] 关于体外亲和力成熟方法的综述,参见例如Hoogenboom,Nature Biotechnology 23:1105-16(2005);Quiroz和Sinclair,Revista Ingenieria Biomedica 4:39-51(2010)以及其中的参考文献。

5.2.6. 抗体的修饰

[0200] 抗体的共价修饰包括在本披露的范围内。共价修饰包括使抗体的靶向氨基酸残基与能够与抗体的选定侧链或N-或C-末端残基反应的有机衍生剂反应。其他修饰包括谷氨酰胺酰和天冬酰胺酰残基分别脱酰胺成相应的谷氨酰胺和天冬酰胺残基、脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酸或苏氨酸残基的羟基磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(参见例如Creighton,Proteins:Structure and Molecular Properties 79-86(1983))、N-末端胺的乙酰化和任何C-末端羧基的酰胺化。

[0201] 包括在本披露范围内的抗体的其他类型的共价修饰包括改变如上所述的抗体或多肽的天然糖基化模式(参见例如Beck等人,Curr.Pharm.Biotechnol.9:482-501(2008);以及Walsh,Drug Discov.Today 15:773-80(2010)),以及以例如美国专利号4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192或4,179,337中所述的方式将抗体连接到多种非蛋白聚合物中的一种,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。结合本披露的GPC3的抗体还可以与一个或多个免疫球蛋白恒定区或其部分(例如Fc)基因融合或缀合以延长半

衰期和/或赋予已知的Fc介导的效应子功能。

[0202] 还可以修饰本披露的结合GPC3的单链抗体以形成嵌合分子,这些嵌合分子包含与另一种异源多肽或氨基酸序列例如表位标签(参见例如Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:523-33 (2003))或IgG分子的Fc区(参见例如Aruffo, *Antibody Fusion Proteins* 221-42 (Chamow和Ashkenazi编辑,1999))融合的结合GPC3的单链抗体。结合GPC3的单链抗体也可用于产生结合GPC3的嵌合抗原受体(CAR),如下文更详细描述。

[0203] 本文还提供了融合蛋白,该融合蛋白包含:结合本披露的GPC3的单链抗体,和异源多肽。在一些实施例中,与抗体基因融合或化学缀合的异源多肽可用于将抗体靶向具有细胞表面表达的GPC3的细胞。

[0204] 本文还提供了结合GPC3抗原的抗体组。在具体的实施例中,抗体组具有不同的结合速率、不同的解离速率、对GPC3抗原的不同亲和力和/或对GPC3抗原的不同特异性。在一些实施例中,组包含约10至约1000种或更多种抗体或由约10至约1000种或更多种抗体组成。抗体组可用于例如96孔或384孔板中,用于诸如ELISA的测定。

5.2.7. 抗体的制备

[0205] 已经描述了制备抗体的方法。参见例如Els Pardon等人, *Nature Protocol*, 9 (3) : 674 (2014)。抗体(例如scFv片段)可以使用本领域已知的方法获得,例如通过免疫骆驼科物种(诸如骆驼或美洲驼)并从中获得杂交瘤,或通过使用本领域已知的分子生物学技术克隆抗体文库并随后通过ELISA用未选择文库的单个克隆或通过使用噬菌体展示进行选择。

[0206] 本文提供的抗体可以通过培养用含有编码抗体的核酸的载体转化或转染的细胞来产生。编码本披露的抗体的多肽组分的多核苷酸序列可以使用标准重组技术获得。所需的多核苷酸序列可以从抗体产生细胞诸如杂交瘤细胞或B细胞中分离并测序。替代性地,可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。一旦获得,将编码多肽的序列插入能够在宿主细胞中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域可获得和已知的许多载体可用于本披露的目的。合适载体的选择将主要取决于待插入载体中的核酸的大小和待用载体转化的特定宿主细胞。适于表达本披露的抗体的宿主细胞包括原核生物诸如古细菌和真细菌,包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体、真核微生物诸如丝状真菌或酵母、无脊椎动物细胞诸如昆虫或植物细胞,以及脊椎动物细胞诸如哺乳动物宿主细胞系。宿主细胞用上述表达载体转化并在常规营养培养基中培养,该常规营养培养基经适当修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。使用本领域已知的标准蛋白纯化方法纯化由宿主细胞产生的抗体。

[0207] 包括载体构建、表达和纯化的抗体产生方法进一步描述于以下文献中:Plückthun等人, *Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation* 203-52 (McCafferty等人编辑,1996); Kwong和Rader, *E. coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments*, *Current Protocols in Protein Science* (2009); Tachibana和Takekoshi, *Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli*, *Antibody Expression and Production* (Al-Rubeai编辑,2011); 以及 *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An编辑,2009)。

[0208] 当然,预期可以采用本领域熟知的替代方法来制备抗GPC3抗体。例如,合适的氨基酸序列或其部分可以通过使用固相技术的直接肽合成来产生(参见例如Stewart等人, *Solid-Phase Peptide Synthesis* (1969); 以及Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-54 (1963))。可以使用人工技术或通过自动化进行体外蛋白合成。抗GPC3抗体的各个部分可以单独化学合成并使用化学或酶促方法组合以产生所需的抗GPC3抗体。替代性地,抗体可以从工程化表达抗体的转基因动物的细胞或体液诸如乳中纯化,如美国专利号5,545,807和5,827,690中披露的。

多克隆抗体

[0209] 多克隆抗体通常通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在动物中产生。使用双功能或衍生剂,例如马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基缀合)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中R和 R^1 独立地为低级烷基),将相关抗原与在待免疫物种中具有免疫原性的蛋白缀合,例如匙孔血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。可以使用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂和MPL-TDM佐剂(单磷酸脂质A,合成的海藻糖二杆菌分枝菌酸酯)。免疫方案可由本领域技术人员选择而无需过度实验。

[0210] 例如,通过将例如100 μg 或5 μg 的蛋白或缀合物(分别用于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂组合并在多个部位皮内注射溶液来对动物进行针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物的免疫。一个月后,通过在多个部位皮下注射,用1/5至1/10原始量的在弗氏完全佐剂中的肽或缀合物对动物进行加强免疫。七至十四天后,对动物取血并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫直到滴度平台期。缀合物也可以在重组细胞培养物中制成蛋白融合物。此外,聚集剂诸如明矾适用于增强免疫反应。

单克隆抗体

[0211] 单克隆抗体获自基本上同质的抗体的群体,即,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)之外,构成该群体的各个抗体是相同的。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征不是离散抗体的混合物。

[0212] 例如,单克隆抗体可以使用Kohler等人, *Nature*, 256:495 (1975) 首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法制备(美国专利号4,816,567)。

[0213] 在杂交瘤方法中,对合适的宿主动物进行免疫以诱导产生或能够产生特异性结合用于免疫的蛋白的抗体的淋巴细胞。替代性地,可以在体外免疫淋巴细胞。然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103页 (Academic Press, 1986))。

[0214] 免疫剂通常包括抗原蛋白或其融合变体。Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 第59-103页。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞。将如此制备的杂交瘤细胞接种并在合适的培养基中生长,该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。优选的永生化骨髓瘤细胞是那些有效融合、支持所选产生抗体的细胞稳定高水平产生抗体并且对培养基诸如HAT培养基敏感的细胞。

[0215] 测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基中针对抗原的单克隆抗体的产生。可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中针对所需抗原的单克隆抗体的存在。此类技术和测定是本领域

已知的。例如,结合亲和力可以通过Munson等人,Anal.Biochem.,107:220(1980)的斯卡查德分析来确定。

[0216] 在鉴定出产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释程序将克隆亚克隆并通过标准方法(上述Goding)生长。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为肿瘤在哺乳动物体内生长。

[0217] 由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化程序例如蛋白A-琼脂糖、羧基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基、腹水或血清中适当地分离。

[0218] 单克隆抗体也可以通过重组DNA方法制备,诸如美国专利号4,816,567中所述和如上所述。使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序编码单克隆抗体的DNA。杂交瘤细胞用作这种DNA的优选来源。一旦分离,可将DNA置于表达载体中,然后将其转染到宿主细胞诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以在此类重组宿主细胞中合成单克隆抗体。关于在细菌中重组表达编码抗体的DNA的综述文章包括Skerra等人,Curr.Opinion in Immunol.,5:256-262(1993)和Plickthun,Immunol.Revs.130:151-188(1992)。

[0219] 在另一个实施例中,可以从使用McCafferty等人,Nature,348:552-554(1990)中描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离抗体。Clackson等人.,Nature,352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)。随后的出版物描述了通过链改组(Marks等人,Bio/Technology,10:779-783(1992))以及组合感染和体内重组产生高亲和力(nM范围)人抗体作为构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse等人,Nucl.Acids Res.,21:2265-2266(1993))。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方案。

[0220] DNA也可以被修饰,例如通过取代编码序列(美国专利号4,816,567;Morrison等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA,81:6851(1984)),或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接到编码序列。此类非免疫球蛋白多肽可以被取代以产生嵌合二价抗体,该嵌合二价抗体包含一个对抗原具有特异性的抗原结合位点和另一个对不同抗原具有特异性的抗原结合位点。

[0221] 嵌合或杂合抗体也可以使用合成蛋白化学中的已知方法(包括涉及交联剂的那些)体外制备。例如,可以使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于此目的合适试剂的实例包括亚氨基硫烷和甲基-4-巯基丁酰亚胺酸盐。

原核细胞中的重组生产

[0222] 编码本披露的抗体的多核酸序列可以使用标准重组技术获得。所需的多核酸序列可以从抗体产生细胞诸如杂交瘤细胞中分离并测序。替代性地,可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。一旦获得,将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域可获得和已知的许多载体可用于本披露的目的。合适载体的选择将主要取决于待插入载体中的核酸的大小和待用载体转化的特定宿主细胞。每种载体含有不同的组分,这取决于其功能(异源多核苷酸的扩增或表达,或两者兼有)及其与其所在的特定宿主细胞的相容性。载体组分通常包括但不限于复制起点、选择标记基因、启

动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入物和转录终止序列。

[0223] 通常,含有源自与宿主细胞相容的物种的复制子和控制序列的质粒载体与这些宿主结合使用。载体通常携带有复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型选择的标记序列。例如,大肠杆菌通常使用pBR322(一种源自大肠杆菌物种的质粒)转化。用于表达特定抗体的pBR322衍生物的实例详细描述于Carter等人的美国专利号5,648,237中。

[0224] 此外,含有与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体可以用作与这些宿主相关的转化载体。例如,噬菌体诸如GEMTM-11可用于制备重组载体,该载体可用于转化易感宿主细胞诸如大肠杆菌LE392。

[0225] 本申请的表达载体可以包含两个或更多个启动子-顺反子对,编码每种多肽组分。启动子是位于调节其表达的顺反子上游(5')的非翻译调控序列。原核启动子通常分为两类,诱导型和组成型。诱导型启动子是响应于培养条件的变化,例如营养物的存在或不存在或温度的变化,启动在其控制下的顺反子的转录水平增加的启动子。

[0226] 被多种潜在宿主细胞识别的大量启动子是众所周知的。选择的启动子可以通过限制酶消化从源DNA除去启动子并将分离的启动子序列插入本申请的载体中而可操作地连接到编码本发明抗体的顺反子DNA。天然启动子序列和许多异源启动子均可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些实施例中,使用异源启动子,因为与天然靶多肽启动子相比,它们通常允许表达的靶基因的更大的转录和更高的产量。

[0227] 适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子、 β -半乳糖苷酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子诸如tac或trc启动子。然而,在细菌中起作用的其他启动子(诸如其他已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。已经披露了它们的核酸序列,从而使得技术人员能够使用接头或衔接子将它们可操作地连接到编码靶肽的顺反子上(Siebenlist等人Cell 20:269(1980)),以提供任何所需的限制性位点。

[0228] 在一方面,重组载体内的每个顺反子包含指导表达的多肽跨膜易位的分泌信号序列组分。通常,信号序列可以是载体的组成部分,或者它可以是插入到载体中的靶多肽DNA的一部分。为了本发明的目的而选择的信号序列应该是被宿主细胞识别和加工(即被信号肽酶切割)的信号序列。对于不识别和加工异源多肽天然信号序列的原核宿主细胞,信号序列可以被原核信号序列取代,该原核信号序列选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP。

[0229] 在一些实施例中,根据本披露的抗体的产生可以发生在宿主细胞的细胞质中,并且因此不需要每个顺反子内存在分泌信号序列。某些宿主菌株(例如,大肠杆菌trxB⁻菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,从而允许所表达的蛋白亚基正确折叠和组装。

[0230] 适于表达本披露的抗体的原核宿主细胞包括古细菌和真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用的细菌的实例包括埃希氏菌属(例如大肠杆菌)、芽孢杆菌属(例如枯草芽孢杆菌)、肠杆菌属、假单胞菌属(例如铜绿假单胞菌)、鼠伤寒沙门氏菌属、粘质沙雷氏菌属、克雷伯氏菌属、变形杆菌属、志贺氏菌属、根瘤菌属、透明颤菌属或副球菌属。在一些实施例中,使用革兰氏阴性细胞。在一个实施例中,大肠杆菌细胞用作宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株W3110(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第2卷(Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第1190-1219页; ATCC保藏号27,325)及其衍生物,包括具有基因型W3110 AfhuA(AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT

A (nmpc-fepE) degP41 kan^R的菌株33D3(美国专利号5,639,635)。其他菌株及其衍生物,例如大肠杆菌294(ATCC31,446)、大肠杆菌B、大肠杆菌1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌RV308(ATCC 31,608)也是合适的。这些实例是说明性的而非限制性的。构建任何上述具有确定基因型的细菌的衍生物的方法是本领域已知的,并描述于例如Bass等人,Proteins,8:309-314(1990)中。考虑到复制子在细菌细胞中的可复制性,通常需要选择合适的细菌。例如,当使用熟知的质粒诸如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410提供复制子时,大肠杆菌、沙雷氏菌属或沙门氏菌属物种可以适合用作宿主。

[0231] 典型地,宿主细胞应分泌最少量的蛋白水解酶,并且另外的蛋白酶抑制剂可以理想地掺入细胞培养物中。

[0232] 宿主细胞用上述表达载体转化并在常规营养培养基中培养,该常规营养培养基经适当修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。转化是指将DNA引入原核宿主,使得DNA可作为染色体外元件或通过染色体整合体复制。根据所使用的宿主细胞,使用适于这些细胞的标准技术进行转化。使用氯化钙的钙处理通常用于含有大量细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法使用聚乙二醇/DMSO。使用的另一种技术是电穿孔。

[0233] 用于产生本申请抗体的原核细胞在本领域已知的培养基中生长,并适于培养所选择的宿主细胞。合适的培养基的实例包括luria肉汤(LB)加上必需的营养补充物。在一些实施例中,培养基还含有基于表达载体的构建而选择的选择剂,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞生长。例如,将氨苄青霉素添加到培养基中,使表达氨苄青霉素抗性基因的细胞生长。

[0234] 除了碳、氮和无机磷酸盐源之外的任何必要的补充物也可以按适当的浓度单独引入或作为与另一种补充物或介质诸如复合氮源的混合物引入。任选地,培养基可以含有一种或多种选自谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙醇酸盐、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇的还原剂。原核宿主细胞在合适的温度和pH下培养。

[0235] 如果在本申请的表达载体中使用诱导型启动子,则在适于启动子激活的条件下诱导蛋白表达。在本申请的一方面,PhoA启动子用于控制多肽的转录。因此,转化的宿主细胞在磷酸盐限制培养基中培养以进行诱导。优选地,磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基(参见例如Simmons等人,J.Immunol.Methods 263:133-147(2002))。根据所使用的载体构建体,可以使用本领域已知的多种其他诱导物。

[0236] 本披露的表达的抗体被分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白回收通常涉及破坏微生物,通常通过诸如渗透压休克、超声处理或裂解的方法。一旦细胞被破坏,可以通过离心或过滤除去细胞碎片或完整细胞。蛋白可以进一步纯化,例如,通过亲和树脂层析法。替代性地,可以将蛋白转运到培养基中并在其中分离。可以从培养物中除去细胞,过滤并浓缩培养物上清液以进一步纯化所产生的蛋白。表达的多肽可以使用通常已知的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和Western印迹测定进一步分离和鉴定。

[0237] 替代性地,通过发酵方法大量进行蛋白生产。各种大规模补料分批发酵程序可用于生产重组蛋白。为了提高本披露的抗体的产量和质量,可以改变各种发酵条件。例如,已证明伴侣蛋白有助于细菌宿主细胞中产生的异源蛋白的正确折叠和溶解。Chen等人JBio Chem 274:19601-19605(1999);美国专利号6,083,715;美国专利号6,027,888;Bothmann和Pluckthun,J.Biol.Chem.275:17100-17105(2000);Ramm和Pluckthun,J.Biol.Chem.275:

17106-17113 (2000); Arie等人, Mol. Microbiol. 39:199-210 (2001)。

[0238] 为了使表达的异源蛋白(尤其是对蛋白水解敏感的那些)的蛋白水解最小化,某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株可用于本发明,如例如美国专利号5,264,365;美国专利号5,508,192;Hara等人, Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)中所述。缺乏蛋白水解酶并用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株可用作编码本申请抗体的表达系统中的宿主细胞。

[0239] 本文产生的抗体可以进一步纯化以获得基本上均质的制剂,用于进一步的测定和用途。可以使用本领域已知的标准蛋白纯化方法。以下程序是合适的纯化程序的示例:免疫亲和或离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅或阳离子交换树脂诸如DEAE上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀和使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤。固定在固相上的蛋白A例如可以在一些实施例中用于本披露的结合分子的免疫亲和纯化。固定蛋白A的固相优选是包含玻璃或二氧化硅表面的柱,更优选受控孔玻璃柱或硅酸柱。在一些实施例中,柱已经用试剂诸如甘油涂覆,以试图防止污染物的非特异性粘附。然后洗涤固相以除去与固相非特异性结合的污染物。最后,通过洗脱从固相中回收目的抗体。

真核细胞中的重组生产

[0240] 对于真核表达,载体组分通常包括但不限于以下中的一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0241] 用于真核宿主的载体还可以包括编码信号序列或在成熟蛋白或多肽的N-末端具有特异性切割位点的其他多肽的插入物。所选择的异源信号序列优选地是被宿主细胞识别和加工(即,被信号肽酶切割)的异源信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可以获得哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹gD信号。这种前体区域的DNA可以在阅读框中与编码本申请抗体的DNA连接。

[0242] 通常,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分(SV40起点通常仅可以使用,因为它含有早期启动子)。

[0243] 表达和克隆载体可以含有选择基因,也称为选择性标记。选择基因可以编码赋予对抗生素或其他毒素(例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素)抗性的蛋白;补体营养缺陷型缺陷;或提供从复合培养基中无法获得的关键营养素。

[0244] 选择方案的一个实例利用药物来阻止宿主细胞的生长。那些用异源基因成功转化的细胞产生一种赋予药物抗性的蛋白,并因此在选择方案中存活下来。这种优势选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0245] 用于哺乳动物细胞的合适的选择性标记的另一个实例是能够鉴定能够摄取编码本申请抗体的核酸的细胞的那些。例如,首先通过在含有氨甲蝶呤(Mtx)(一种DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有转化体来鉴定用DHFR选择基因转化的细胞。当使用野生型DHFR时,示例性的合适宿主细胞是DHFR活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。替代性地,用编码DNA序列的多肽、野生型DHFR蛋白和另一种选择性标记诸如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源性DHFR的野生型宿主)可以通过在含有用于选择性标记的选择剂诸如氨基糖苷类抗生素的培养基中的细胞生长来选择。

[0246] 表达和克隆载体通常含有启动子,该启动子被宿主生物识别并可操作地连接到编码所需多肽序列的核酸。真核基因具有富含AT的区域,位于转录起始位点上游大约25至30

个碱基处。可以包括在许多基因转录开始的上游70至80个碱基处发现的另一序列。大多数真核生物的3'末端可以是用于将聚腺苷酸尾添加到编码序列的3'末端的信号。所有这些序列都可以插入真核表达载体。

[0247] 来自哺乳动物宿主细胞中的载体的多肽转录可以例如通过从病毒(诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40))的基因组获得的启动子、异源哺乳动物启动子(例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)、热激启动子来控制,只要这些启动子与宿主细胞系统相容。

[0248] 高等真核生物对编码本披露的抗体的DNA的转录通常通过将增强子序列插入到载体中来增加。现在已知许多来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。实例包括位于复制起点晚期侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点晚期侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。也参见Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) 关于用于激活真核启动子的增强元件。增强子可以在多肽编码序列的5'或3'位置处剪接到载体中,但优选地位于启动子的5'位点。

[0249] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物体的有核细胞)的表达载体也含有终止转录和稳定mRNA所需的序列。此类序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'和有时3'非翻译区获得。这些区域含有在编码mRNA的多肽的非翻译部分中转录为聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。一种有用的转录终止组分是牛生长激素聚腺苷酸化区。

[0250] 用于在本文载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞包括本文所述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。在培养(组织培养)中脊椎动物细胞的增殖已经成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾细胞系(293或293细胞亚克隆用于在悬浮培养中生长, Graham等人, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980));小鼠支持细胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞(BRL3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TR1细胞(Mather等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌细胞系(Hep G2)。

[0251] 宿主细胞可以用上述用于抗体产生的表达或克隆载体转化并在常规营养培养基中培养,该常规营养培养基经适当修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0252] 用于产生本申请抗体的宿主细胞可以在多种培养基中培养。市售培养基诸如Ham's F10 (Sigma)、最低限度必需培养基(MEM), (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)和杜氏改良伊格尔培养基(DMEM), (Sigma)适于培养宿主细胞。此外, Ham等人, *Meth. Enz.* 58:44 (1979)、Barnes等人, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)、美国专利号4,767,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655或5,122,469、WO 90/03430、WO87/00195或美国专利再颁发30,985中描述的任何培养基都可以用作宿主细胞的培养基。这些培养基中的任一种都可以根据需要补充激

素和/或其他生长因子(诸如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(诸如HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如GENTAMYCINTM药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔范围内的最终浓度存在的无机化合物)和葡萄糖或等效能源。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其他必要的补充物。培养条件诸如温度、pH等是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些,并且对于普通技术人员将是显而易见的。

[0253] 当使用重组技术时,抗体可以在细胞内、周质间隙中产生,或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生,作为第一步,例如通过离心或超滤除去颗粒碎片,宿主细胞或裂解片段。当抗体分泌到培养基中时,通常首先使用市售的蛋白浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置)浓缩来自这种表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂诸如PMSF可以包括在任何前述步骤中以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0254] 从细胞制备的蛋白组合物可以使用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化,其中亲和层析是优选的纯化技术。亲和配体所连接的基质通常是琼脂糖,但其他基质也是可用的。与琼脂糖相比,机械稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯允许更快的流速和更短的处理时间。根据要回收的抗体,也可以使用其他蛋白纯化技术,诸如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的肝素SEPHAROSETM层析、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。在任何一个或多个初步纯化步骤之后,可以对包含目的抗体和污染物的混合物进行低pH疏水相互作用层析。

5.2.8. 包含抗体的其他结合分子

[0255] 在另一方面,本文提供了包含本文提供的抗GPC3抗体的结合分子。除了如下文第5.3部分中所述的本文提供的嵌合抗原受体(CAR)之外,在一些实施例中,本文提供的针对GPC3的抗体也是其他结合分子的一部分。本文描述了本披露的示例性结合分子。

融合蛋白

[0256] 在各种实施例中,本文提供的抗体可以与另一种药剂例如基于蛋白的实体基因融合或化学缀合。抗体可以与药剂化学缀合,或者以其他方式与药剂非共价缀合。药剂可以是肽或抗体(或其片段)。

[0257] 因此,在一些实施例中,本文提供了与异源蛋白或多肽(或其片段,例如约10个、约20个、约30个、约40个、约50个、约60个、约70个、约80个、约90个、约100个、约150个、约200个、约250个、约300个、约350个、约400个、约450个或约500个氨基酸或超过500个氨基酸的多肽)重组融合或化学缀合(共价或非共价缀合)以产生融合蛋白的抗体,以及其用途。具体地,本文提供了包含本文提供的抗体的抗原结合片段(例如,CDR1、CDR2和/或CDR3)和异源蛋白、多肽或肽的融合蛋白。

[0258] 此外,本文提供的抗体可以与标记或“标签”序列(诸如肽)融合以促进纯化。在具体的实施例中,标记或标签氨基酸序列是六组氨酸肽、血凝素(“HA”)标签和“FLAG”标签。

[0259] 将部分(包括多肽)与抗体融合或缀合的方法是已知的(参见例如Arnon等人, Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 243-56 (Reisfeld等人编辑,1985);

Hellstrom等人, *Antibodies for Drug Delivery, Controlled Drug Delivery* 623-53 (Robinson等人编辑, 第2版, 1987); Thorpe, *Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review, Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications* 475-506 (Pinchera等人编辑, 1985); *Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* 303-16 (Baldwin等人编辑, 1985); Thorpe等人, *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982); 美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851、5,723,125、5,783,181、5,908,626、5,844,095和5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; PCT公开WO 91/06570、WO 96/04388、WO 96/22024、WO 97/34631和WO 99/04813; Ashkenazi等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10535-39 (1991); Traunecker等人, *Nature*, 331:84-86 (1988); Zheng等人, *J. Immunol.* 154:5590-600 (1995); 以及Vil等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-41 (1992)。

[0260] 融合蛋白可以通过例如基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)技术产生。DNA改组可用于改变本文提供的抗体的活性,包括例如具有较高亲和力和较低解离速率的抗体(参见例如美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252和5,837,458; Patten等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33 (1997); Harayama, *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82 (1998); Hansson等人, *J. Mol. Biol.* 287:265-76 (1999); 以及Lorenzo和Blasco, *Biotechniques* 24(2):308-13 (1998)。抗体或编码的抗体可以在重组前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变而改变。编码本文提供的抗体的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一种或多种组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0261] 在一些实施例中,本文提供的抗体与第二抗体缀合以形成抗体异源缀合物。

[0262] 在各种实施例中,抗体与药剂基因融合。基因融合可以通过在抗体与药剂之间放置接头(例如,多肽)来实现。接头可以是柔性接头。

[0263] 在各种实施例中,抗体与治疗性分子基因缀合,其中铰链区将抗体与治疗分子连接。

[0264] 本文还提供了制备本文提供的各种融合蛋白的方法。上文第5.2.7部分中描述的各种方法也可用于制备本文提供的融合蛋白。

[0265] 在具体的实施例中,重组表达本文提供的融合蛋白。本文提供的融合蛋白的重组表达可能需要构建含有编码该蛋白或其片段的多核苷酸的表达载体。一旦获得了编码本文提供的蛋白或其片段的多核苷酸,就可以使用本领域熟知的技术通过重组DNA技术生产用于产生该分子的载体。因此,本文描述了通过表达含有编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白的方法。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。还提供了可复制载体,其包含可操作地连接到启动子的编码本文提供的融合蛋白或其片段或CDR的核苷酸序列。

[0266] 可以通过常规技术将表达载体转移到宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生本文提供的融合蛋白。因此,本文还提供了含有可操作地连接到异源启动子的编码本文提供的融合蛋白或其片段的多核苷酸的宿主细胞。

[0267] 多种宿主表达载体系统可用于表达本文提供的融合蛋白。此类宿主表达系统代表媒介物,目的编码序列可以通过这些媒介物产生并随后纯化,但也代表细胞,当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时,这些细胞可以原位表达本文提供的融合蛋白。这些包括但不限于微生物,诸如用含有编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用含有编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如毕赤酵母);用含有编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒、CaMV、烟草花叶病毒、TMV)感染或用含有编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或含有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、NS0和3T3细胞),这些重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。细菌细胞诸如大肠杆菌,或真核细胞,特别是用于表达完整重组抗体分子的细菌细胞,可用于表达重组融合蛋白。例如,哺乳动物细胞诸如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)与载体诸如来自人巨细胞病毒的主要立即早期基因启动子元件结合是抗体或其变体的有效表达系统。在具体的实施例中,编码本文提供的融合蛋白的核苷酸序列的表达由组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调控。

[0268] 在细菌系统中,根据所表达的融合蛋白的预期用途,可以有利地选择多种表达载体。例如,当要产生大量的这种融合蛋白时,为了产生融合蛋白的药物组合物,可能需要指导易于纯化的高水平融合蛋白产物表达的载体。这些载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等人,EMBO 12:1791(1983)),其中编码序列可以与lac Z编码区在框架中单独连接到载体中,从而产生融合蛋白;pIN载体(Inouye&Inouye,Nucleic Acids Res.13:3101-3109(1985);Van Heeke&Schuster,J.Biol.Chem.24:5503-5509(1989));等。pGEX载体也可用于将外源多肽表达为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。通常,此类融合蛋白是可溶的,并且可以通过吸附和结合于基质谷胱甘肽琼脂糖珠,然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱,从而容易地从裂解细胞中纯化。设计pGEX载体以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0269] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用许多基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,目的编码序列可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。然后通过体外或体内重组将该嵌合基因插入到腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区域(例如,区域E1或E3)中的插入将产生生活的并且能够在受感染的宿主中表达融合蛋白的重组病毒(例如参见Logan&Shenk,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359(1984))。插入的编码序列的有效翻译也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以具有多种来源,包括天然的和合成的。可以通过包含适当的转录增强子元件、转录终止子等来提高表达效率(参见例如Bittner等人,Methods in Enzymol.153:51-544(1987))。

[0270] 此外,可以选择调节插入序列表达或以所需特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白产物的此类修饰(例如糖基化)和加工(例如切割)对于蛋白的功能可能很重要。不同的宿主细胞具有用于蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,

可以使用具有适当加工初级转录物、糖基化和基因产物磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0 (不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。

[0271] 为了长期、高产率地生产重组蛋白,可以利用稳定的表达。例如,可以工程化稳定表达融合蛋白的细胞系。除了使用含有病毒复制起点的表达载体,宿主细胞可以用由合适的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和选择性标记控制的DNA转化。在引入外源DNA后,可以使工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后转入选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并允许细胞将质粒稳定地整合到它们的染色体中并生长形成病灶,病灶又可以被克隆并扩增成细胞系。该方法可以有利地用于工程化表达融合蛋白的细胞系。这种工程化细胞系在筛选和评估与结合分子直接或间接相互作用的组合物方面可能特别有用。

[0272] 可以使用许多选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,Cell 11:223 (1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska&Szybalski, Proc.Natl.Acad.Sci.USA48:202 (1992))和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy等人,Cell122:8-17 (1980))基因可以分别用于tk-、hgp^rt-或ap^rt-细胞。此外,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人,Natl.Acad.Sci.USA77:357 (1980); O'Hare等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA78:1527 (1981)); gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072 (1981)); neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu和Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596 (1993); Mulligan,Science 260:926-932 (1993); 以及Morgan和Anderson,Ann.Rev.Biochem.62:191-217 (1993); May,TIB TECH11 (5):155-2 15 (1993)); 以及hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,Gene 30:147 (1984))。重组DNA技术领域通常已知的方法可以常规用于选择所需的重组克隆,并且这些方法在例如以下文献中进行了描述:Ausubel等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons, NY (1993); Krieglner,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press, NY (1990); 以及Dracopoli等人(编辑),Current Protocols in Human Genetics,第12章和第13章,John Wiley&Sons, NY (1994); Colberre-Garapin等人,J.Mol.Biol.150:1 (1981),这些文献通过援引以其全文并入本文。

[0273] 融合蛋白的表达水平可以通过载体扩增来提高(对于综述,参见Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷(Academic Press,New York,1987))。当表达融合蛋白的载体系统中的标记是可扩增的时,存在于宿主细胞培养物中的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增区域与融合蛋白基因相关,因此融合蛋白的产生也将增加(Crouse等人,Mol.Cell.Biol.3:257 (1983))。

[0274] 宿主细胞可以与本文提供的多种表达载体共转染。载体可以含有相同的选择性标记,这些选择性标记能够使得相应的编码多肽同等表达。替代性地,可以使用编码并能够表达多种多肽的单一载体。编码序列可以包含cDNA或基因组DNA。

[0275] 一旦本文提供的融合蛋白已经通过重组表达产生,可以通过本领域已知的用于纯化多肽(例如,免疫球蛋白分子)的任何方法,例如,通过层析(例如,离子交换、亲和性,特别是通过蛋白A后对特定抗原的亲和性、尺寸柱层析和Kappa select亲和层析)、离心、差异溶解度或通过用于纯化蛋白的任何其他标准技术来纯化。此外,本文提供的融合蛋白分子可以与本文所述或本领域已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

免疫缀合物

[0276] 在一些实施例中,本披露还提供了免疫缀合物,这些免疫缀合物包含与一种或多种细胞毒性剂诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白毒素、细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素缀合的本文所述的任何抗GPC3抗体。

[0277] 在一些实施例中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,包括但不限于美登木素(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235B1);奥瑞他汀,例如单甲基奥瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483、5,780,588和7,498,298);尾海兔素;加利车霉素或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);以及Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环霉素诸如道诺霉素或阿霉素(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);以及美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛;紫杉烷,诸如多西他赛、紫杉醇、拉洛他赛、替司他赛和奥他赛;单端孢霉烯;以及CC1065。

[0278] 在一些实施例中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文所述的抗体,该酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莫迪素A链、 α -八叠球菌素、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、丝裂霉素、局限曲霉素、酚霉素、依诺霉素和端孢菌素。

[0279] 在一些实施例中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于制备放射性缀合物。实例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测时,它可以包含用于闪烁照相研究的放射性原子,例如tc99m或I123,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记,诸如再次碘-123、碘-131、钷-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0280] 抗体和细胞毒性剂的缀合物可以使用多种双官能蛋白偶联剂制备,诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(诸如己二酰亚氨酸二甲酯HC1)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如

Vitetta等人, Science 238:1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见W094/11026。

[0281] 接头可以是促进细胞中缀合剂释放的“可切割接头”,但本文也考虑了不可切割接头。用于本披露的缀合物的接头包括但不限于酸不稳定接头(例如脲接头)、含二硫键的接头、肽酶敏感接头(例如包含氨基酸的肽接头,这些氨基酸例如缬氨酸和/或瓜氨酸,诸如瓜氨酸-缬氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸)、光不稳定接头、二甲基接头、硫醚接头或设计成规避多药物转运蛋白介导的抗性的亲水性接头。

[0282] 本文的免疫缀合物或ADC考虑但不限于用交联剂制备的此类缀合物,这些交联剂包括但不限于可商购获得(例如,得自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)的BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砵)苯甲酸酯)。

[0283] 在其他实施例中,本文提供的抗体与例如诊断分子缀合或重组融合。这样的诊断和检测可以例如通过将抗体与可检测物质偶联来完成,这些可检测物质包括但不限于各种酶,诸如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,诸如但不限于链霉亲和素/生物素或亲和素/生物素;荧光材料,诸如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,诸如但不限于鲁米诺;生物发光材料,诸如但不限于荧光素酶、荧光素或水母发光蛋白;化学发光材料,诸如 ^{225}Ac γ 发射、俄歇发射、 β 发射、 α 发射或正电子发射放射性同位素。

5.3. 嵌合抗原受体

[0284] 在另一方面,本文提供了包含细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR),该细胞外抗原结合结构域包含本文提供的结合GPC3的抗体(例如scFv)。包含本发明scFv片段的示例性CAR如下文第6部分所例示。

[0285] 在一些实施例中,本文提供的嵌合抗原受体(CAR)包含多肽,该多肽包含:(a)细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域包含一种或多种如本文提供的特异性结合GPC3的抗体,以及任选的一种或多种另外的结合结构域;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。下面更详细地描述每个部件和另外的区域。

5.3.1. 细胞外抗原结合结构域

[0286] 本文所述的CAR的细胞外抗原结合结构域包含一种或多种(例如1、2、3、4、5、6或更多种中的任一种)抗体。抗体可以通过肽键或通过肽接头彼此直接融合。

抗体

[0287] 本披露的CAR包含细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域包含本文提供的一种或多种抗体。抗体可以具有相同或不同的来源,并且具有相同或不同的大小。示例性抗体包括但不限于上文第5.2部分中所述的scFv片段。

[0288] 在一些实施例中,本文提供了包含多肽的CAR,该多肽包含:(a)细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域包含抗GPC3抗体(例如scFv);(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域,其中抗GPC3抗体是如上文第5.2部分中所述的抗GPC3抗体,包括例如包含表3和表4中的一个或多个CDR的那些。

[0289] 更具体地,在一些实施例中,本文提供了包含多肽的CAR,该多肽包含:(a)细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域包含抗GPC3抗体(例如scFv片段);(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域,其中抗GPC3抗体(例如scFv)包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的LCDR3,或(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的LCDR3,或(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的LCDR3,或(iv)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的LCDR3,或(v)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的LCDR3,或(vi)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的LCDR3,或(vii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的LCDR3,或(viii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的LCDR3,或(ix)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的LCDR3,或(x)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施例中,抗体(例如scFv)包含选自SEQ ID NO:61-70和117-122的组的VH结构域和选自SEQ ID NO:71-80和123-125的组的VL结构域。在更具体的实施例中,抗体是包含与SEQ ID NO:81-90、128和129中任一个的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的scFv。

[0290] 在其他实施例中,细胞外抗原结合结构域进一步包含一个或多个另外的抗原结合结构域。与一种或多种另外的抗原结合的一种或多种另外的结合结构域,例如靶向一种或

多种另外的抗原的1、2、3、4个或更多个另外的抗体结合区(抗体)。

[0291] 在一些实施例中,由本披露的CAR靶向的另外的一个或多个抗原是细胞表面分子。可以选择抗体以识别作为与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标记的抗原。在一些实施例中,抗原是肿瘤抗原。在一些实施例中,肿瘤抗原是肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。TSA是肿瘤细胞所特有的,并且不存在于体内的其他细胞上。TAA相关抗原不是肿瘤细胞所特有的,相反,它也可以在不能诱导对抗原的免疫耐受状态的情况下在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达可以在使免疫系统能够对抗原作出应答的条件下发生。TAA可能是在胚胎发育期间在正常细胞上表达的抗原,此时免疫系统不成熟且不能作出应答,或者它们可能是在正常细胞上通常以极低的水平存在但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达的抗原。

[0292] 除了细胞外结构域中的抗原结合结构域之外,本文提供的CAR还可以包含以下中的一种或多种:接头(例如,肽接头)、跨膜结构域、铰链区、信号肽、细胞内信号传导结构域、共刺激信号传导结构域,其各自在下文更详细地描述。

[0293] 例如,在一些实施例中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(诸如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该初级细胞内信号传导结构域源自CD3 ζ 。在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施例中,共刺激信号传导结构域源自选自自由CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合组成的组的共刺激分子。在一些实施例中,共刺激信号传导结构域源自CD137。在一些实施例中,GPC3 CAR进一步包含位于细胞外抗原结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域(诸如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施例中,GPC3 CAR进一步包含位于多肽的N-末端的信号肽(诸如CD8 α 信号肽)。在一些实施例中,多肽从N-末端到C-末端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、源自CD137的共刺激信号传导结构域和源自CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,GPC3 CAR是单特异性的。在一些实施例中,GPC3 CAR是单价的。在一些实施例中,GPC3 CAR是多特异性的。在一些实施例中,GPC3 CAR是多价的。

肽接头

[0294] 在本发明CAR中存在多种抗体的情况下,各种抗体可以通过肽接头彼此融合。在一些实施例中,抗体彼此直接融合而没有任何肽接头。连接不同抗体的肽接头可以相同或不同。CAR的不同结构域也可以通过肽接头彼此融合。

[0295] 取决于抗体和/或各种结构域的结构和/或功能特征,CAR中的每个肽接头可以具有相同或不同的长度和/或序列。可以独立地选择和优化每个肽接头。CAR中使用的一个或多个肽接头的长度、柔性程度和/或其他性质可以对性质具有一些影响,包括但不限于对一种或多种特定抗原或表位的亲和力、特异性或亲合力。例如,可以选择更长的肽接头以确保两个相邻结构域不会在空间上相互干扰。在一些实施例中,短肽接头可以设置在CAR的跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些实施例中,肽接头包含柔性残基(诸如甘氨酸和丝氨酸),使得相邻结构域相对于彼此自由移动。例如,甘氨酸-丝氨酸双联体可以是合适的肽接头。

[0296] 肽接头可以具有任何合适的长度。在一些实施例中,肽接头的长度为至少约以下

中的任何一者：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100个或更多个氨基酸。在一些实施例中，肽接头的长度为不超过约以下中的任何一者：100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5个或更少个氨基酸。在一些实施例中，肽接头的长度为以下中的任何一者：约1个氨基酸至约10个氨基酸、约1个氨基酸至约20个氨基酸、约1个氨基酸至约30个氨基酸、约5个氨基酸至约15个氨基酸、约10个氨基酸至约25个氨基酸、约5个氨基酸至约30个氨基酸、约10个氨基酸至约30个氨基酸长、约30个氨基酸至约50个氨基酸、约50个氨基酸至约100个氨基酸或约1个氨基酸至约100个氨基酸。

[0297] 肽接头可具有天然存在的序列或非天然存在的序列。例如，源自仅重链抗体的铰链区的序列可以用作接头。参见例如WO 1996/34103。在一些实施例中，肽接头是柔性接头。示例性柔性接头包括但不限于甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。本领域已知的其他接头，例如，如WO 2016014789、WO 2015158671、WO 2016102965、US20150299317、WO 2018067992、US7741465、Colcher等人，J.Nat.Cancer Inst.82:1191-1197 (1990) 和Bird等人，Science 242:423-426 (1988) 中所述的，也可以包括在本文提供的CAR中，其各自的披露内容通过援引并入本文。

5.3.2. 跨膜结构域

[0298] 本披露的CAR包含可以直接或间接与细胞外抗原结合结构域融合的跨膜结构域。跨膜结构域可源自天然或合成来源。如本文所用，“跨膜结构域”是指在细胞膜，优选真核细胞膜中热力学稳定的任何蛋白结构。适用于本文所述的CAR的跨膜结构域可获自天然存在的蛋白。替代性地，其可以是合成的、非天然存在的蛋白区段，例如，在细胞膜中热力学稳定的疏水蛋白区段。

[0299] 根据跨膜结构域的三维结构对跨膜结构域进行分类。例如，跨膜结构域可以形成 α 螺旋、多于一个的 α 螺旋的复合物、 β 桶、或能够跨越细胞的磷脂双层的任何其他稳定结构。另外，跨膜结构域也可以或替代性地根据跨膜结构域拓扑结构进行分类，包括跨膜结构域穿过膜的次数和蛋白的取向。例如，单途径膜蛋白穿过细胞膜一次，而多途径膜蛋白穿过细胞膜至少两次（例如，2、3、4、5、6、7或更多次）。膜蛋白可被定义为I型、II型或III型，这取决于其末端和一个或多个膜通过区段相对于细胞内部和外部的拓扑结构。I型膜蛋白具有单个跨膜区，并且其定向为使得蛋白的N-末端存在于细胞的脂质双层的细胞外侧，而该蛋白的C-末端存在于胞内侧。II型膜蛋白也具有单个跨膜区，但其定向为使得蛋白的C-末端存在于细胞的脂质双层的细胞外侧，而该蛋白的N-末端存在于胞内侧。III型膜蛋白具有多个跨膜区段，并且可根据跨膜区段的数量和N-末端和C-末端的位置进一步分类。

[0300] 在一些实施例中，本文所述的CAR的跨膜结构域源自I型单途径膜蛋白。在一些实施例中，来自多途径膜蛋白的跨膜结构域也可以与用于本文所述的CAR相容。多途径膜蛋白可以包含复合物（至少2、3、4、5、6、7或更多） α 螺旋或 β 折叠结构。在一些实施例中，多途径膜蛋白的N-末端和C-末端存在于脂质双层的相对侧，例如，蛋白的N-末端存在于脂质双层的胞内侧，而该蛋白的C-末端存在于细胞外侧。

[0301] 在一些实施例中，CAR的跨膜结构域包含选自以下的跨膜结构域：T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、

CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD160、GPC3、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D和/或NKG2C的跨膜结构域。在一些实施例中，跨膜结构域源自选自自由CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组的分子。

[0302] 在一些具体的实施例中，跨膜结构域源自CD8 α 。在一些实施例中，跨膜结构域是包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的CD8 α 的跨膜结构域。

[0303] 用于本文所述的CAR的跨膜结构域还可以包含合成的、非天然存在的蛋白区段的至少一部分。在一些实施例中，跨膜结构域是合成的、非天然存在的 α 螺旋或 β 折叠。在一些实施例中，蛋白区段为至少约20个氨基酸，例如至少18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个氨基酸。合成的跨膜结构域的实例是本领域已知的，例如在美国专利号7,052,906和PCT公开号W02000/032776中，其相关披露内容通过援引并入本文。

[0304] 本文提供的跨膜结构域可以包含跨膜区和位于跨膜结构域的C-末端侧的胞内区。跨膜结构域的胞内区可包含三个或更多个氨基酸，并且在一些实施例中，有助于使跨膜结构域在脂质双层中定向。在一些实施例中，一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的跨膜区中。在一些实施例中，一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的胞内区中。在一些实施例中，跨膜结构域的胞内区包含带正电荷的氨基酸。在一些实施例中，跨膜结构域的胞内区包含氨基酸精氨酸、丝氨酸和赖氨酸。

[0305] 在一些实施例中，跨膜结构域的跨膜区包含疏水性氨基酸残基。在一些实施例中，本文提供的CAR的跨膜结构域包含人工疏水性序列。例如，苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体可以存在于跨膜结构域的C末端处。在一些实施例中，跨膜区主要包含疏水性氨基酸残基，例如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或缬氨酸。在一些实施例中，跨膜区是疏水性的。在一些实施例中，跨膜区包含聚亮氨酸-丙氨酸序列。蛋白或蛋白区段的亲水性或者疏水性或亲水性特征可以通过本领域已知的任何方法来评估，例如Kyte和Doolittle亲水性分析。

5.3.3. 细胞内信号传导结构域

[0306] 本披露的CAR包含细胞内信号传导结构域 (ISD)。细胞内信号传导结构域负责激活表达CAR的免疫效应细胞的至少一种正常效应子功能。术语“效应子功能”是指细胞的专门功能。T细胞的效应子功能例如可为细胞溶解活性，或辅助活性，包括分泌细胞因子。因此，术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应子功能信号并指导细胞执行特定功能的蛋白部分。虽然通常可以使用整个胞内信号传导结构域，但在许多情况下不需要使用整个链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言，可以使用这种截短部分代替完整链，只要它转导效应子功能信号。因此，术语胞内信号传导结构域意指包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0307] 在一些实施例中，细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传

导结构域。在一些实施例中，CAR包含基本上由免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域组成的细胞内信号传导结构域。“初级细胞内信号传导结构域”是指以刺激性方式起作用以诱导免疫效应子功能的胞内信号传导序列。在一些实施例中，初级细胞内信号传导结构域含有称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM的信号传导基序。如本文所用，“ITAM”是保守蛋白基序，其通常存在于许多免疫细胞中表达的信号传导分子的尾部。基序可以包含由6-8个氨基酸分开的氨基酸序列YxxL/I的两个重复，其中每个x独立地为任何氨基酸，产生保守基序YxxL/I_x (6-8) YxxL/I。信号传导分子内的ITAM对于细胞内的信号转导很重要，该信号转导至少部分由信号传导分子激活后ITAM中的酪氨酸残基的磷酸化介导。ITAM也可以作为参与信号传导途径的其他蛋白的对接位点。示例性含有ITAM的初级胞内信号序列包括源自CD3 ζ 、FcR γ (FCER1G)、FcR β (Fc ϵ Rib)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。

[0308] 在一些实施例中，该初级细胞内信号传导结构域源自CD3 ζ 。在一些实施例中，细胞内信号传导结构域由CD3 ζ 的胞内信号传导结构域组成。在一些实施例中，初级细胞内信号传导结构域是野生型CD3 ζ 的胞内信号传导结构域。在一些实施例中，CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列。在一些实施例中，野生型CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施例中，初级细胞内信号传导结构域是含有一个或多个突变的CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的功能突变体，诸如Q65K。

5.3.4. 共刺激信号传导结构域

[0309] 除了刺激抗原特异性信号之外，许多免疫效应细胞还需要共刺激，以促进细胞增殖、分化和存活，以及激活细胞的效应子功能。在一些实施例中，CAR包含至少一个共刺激信号传导结构域。如本文所用，术语“共刺激信号传导结构域”是指介导细胞内信号转导以诱导免疫应答（例如，效应子功能）的蛋白的至少一部分。本文所述的嵌合受体的共刺激信号传导结构域可以是来自共刺激蛋白的胞内信号传导结构域，其转导信号并调节由免疫细胞诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞介导的反应。“共刺激信号传导结构域”可以是共刺激分子的胞内部分。术语“共刺激分子”是指免疫细胞（例如，T细胞）上的同源结合配偶体，其与共刺激配体特异性结合，从而介导免疫细胞的共刺激应答，例如但不限于增殖和存活。

[0310] 在一些实施例中，细胞内信号传导结构域包含单个共刺激信号传导结构域。在一些实施例中，细胞内信号传导结构域包含两个或更多个（例如，约2、3、4个或更多个中的任一个）共刺激信号传导结构域。在一些实施例中，细胞内信号传导结构域包含两个或更多个相同的共刺激信号传导结构域。在一些实施例中，细胞内信号传导结构域包含来自不同共刺激蛋白（例如，本文所述的任两个或更多个共刺激蛋白）的两个或更多个共刺激信号传导结构域。在一些实施例中，细胞内信号传导结构域包含初级细胞内信号传导结构域（诸如CD3 ζ 的胞内信号传导结构域）和一个或多个共刺激信号传导结构域。在一些实施例中，一个或多个共刺激信号传导结构域和初级细胞内信号传导结构域（诸如CD3 ζ 的胞内信号传导结构域）通过任选的肽接头彼此融合。初级细胞内信号传导结构域和一个或多个共刺激信号传导结构域可以按任何合适的顺序排列。在一些实施例中，一个或多个共刺激信号传导结构域位于跨膜结构域与初级细胞内信号传导结构域（诸如CD3 ζ 的胞内信号传导结构域）之间。多个共刺激信号传导结构域可提供累加或协同刺激作用。

[0311] 宿主细胞(例如,免疫细胞)中共刺激信号传导结构域的激活可诱导细胞增加或减少细胞因子的产生和分泌、吞噬性质、增殖、分化、存活和/或细胞毒性。任何共刺激分子的共刺激信号传导结构域可适用于本文所述的CAR。共刺激信号传导结构域的类型基于诸如效应分子将在其中表达的免疫效应细胞的类型(例如,T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)和所需的免疫效应子功能(例如,ADCC效应)等因素来选择。用于CAR的共刺激信号传导结构域的实例可以是共刺激蛋白的胞内信号传导结构域,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和PDCD6);TNF超家族的成员(例如,4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素- α /TNF- β 、OX40/TNFRSF4、OX40配体/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- α 和TNF RII/TNFRSF1B);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和SLAM/CD150);以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、HLA I类、HLA-DR、Ikaros、整合素 α 4/CD49d、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、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)和NKG2C。

[0312] 在一些实施例中,一个或多个共刺激信号传导结构域选自由以下组成的组:CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和特异性结合CD83(诸如CD83和MD2)的配体。

[0313] 在一些实施例中,本披露的CAR中的细胞内信号传导结构域包含源自CD137的共刺激信号传导结构域(即4-1BB)。在一些实施例中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的胞内信号传导结构域和CD137的共刺激信号传导结构域。在一些实施例中,细胞内信号传导结构域包含CD137的共刺激信号传导结构域,其包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列。

[0314] 本文所述的任何共刺激信号传导结构域的变体也在本披露的范围内,使得共刺激信号传导结构域能够调节免疫细胞的免疫应答。在一些实施例中,与野生型对应物相比,共刺激信号传导结构域包含多达10个氨基酸残基变化(例如,1、2、3、4、5或8个)。包含一个或多个氨基酸变化的此类共刺激信号传导结构域可称为变体。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域,共刺激信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号转导的增加和增强的对免疫应答的刺激。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域,共刺激信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号转导的减少和降低的对免疫应答的刺激。

5.3.5. 铰链区

[0315] 本披露的CAR可以包含位于细胞外抗原结合结构域与跨膜结构域之间的铰链结构域。铰链结构域是通常在蛋白的两个结构域之间发现的氨基酸区段,并且可以允许蛋白的柔性和一个或两个结构域相对于彼此的运动。可以使用提供细胞外抗原结合结构域相对于效应分子的跨膜结构域的这种柔性和运动的任何氨基酸序列。

[0316] 铰链结构域可以含有约10-100个氨基酸,例如约15-75个氨基酸、20-50个氨基酸或30-60个氨基酸中的任一个。在一些实施例中,铰链结构域的长度可以是至少约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或75个氨基酸中的任一个。

[0317] 在一些实施例中,铰链结构域是天然存在的蛋白的铰链结构域。本领域已知的包含铰链结构域的任何蛋白的铰链结构域均适用于本文所述的嵌合受体。在一些实施例中,铰链结构域是天然存在的蛋白的铰链结构域的至少一部分,并且赋予嵌合受体柔性。在一些实施例中,该铰链结构域源自CD8 α 。在一些实施例中,铰链结构域是CD8 α 的铰链结构域的一部分,例如,含有CD8 α 的铰链结构域的至少15个(例如20、25、30、35或40个)连续氨基酸的片段。在一些实施例中,CD8 α 的铰链结构域包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。

[0318] 抗体(诸如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体)的铰链结构域也适用于本文所述的pH依赖性嵌合受体系统。在一些实施例中,铰链结构域是连接抗体的恒定结构域CH1和CH2的铰链结构域。在一些实施例中,铰链结构域是抗体的铰链结构域,并且包含抗体及该抗体的一个或多个恒定区的铰链结构域。在一些实施例中,铰链结构域包含抗体及该抗体的CH3恒定区的铰链结构域。在一些实施例中,铰链结构域包含抗体及该抗体的CH2和CH3恒定区的铰链结构域。在一些实施例中,抗体是IgG、IgA、IgM、IgE、或IgD抗体。在一些实施例中,抗体是IgG抗体。在一些实施例中,抗体是IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4抗体。在一些实施例中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH2和CH3恒定区。在一些实施例中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH3恒定区。

[0319] 非天然存在的肽也可用作本文所述的嵌合受体的铰链结构域。在一些实施例中,Fc受体的细胞外配体结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域是肽接头,诸如(GxS)_n接头,其中x和n可以独立地为介于3和12之间的整数,包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更大。

5.3.6. 信号肽

[0320] 本披露的CAR可以包含多肽的N-末端处的信号肽(也称为信号序列)。通常,信号肽是将多肽靶向细胞中所需的位点的肽序列。在一些实施例中,信号肽将效应分子靶向细胞的分泌途径,并允许效应分子整合和锚定到脂质双层中。适用于本文所述的CAR且包含天然存在的蛋白的信号序列或合成的、非天然存在的信号序列的信号肽对于本领域技术人员将是显而易见的。在一些实施例中,信号肽源自选自由CD8 α 、GM-CSF受体 α 和IgG1重链组成的组的分子。在一些实施例中,信号肽源自CD8 α 。在一些实施例中,CD8 α 的信号肽包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

5.3.7. 包含CAR和另外的结构域的多肽

[0321] 如下文第6部分所示,表达CAR和外源引入的p40和CCL-19的工程化免疫效应细胞产生令人惊讶的优异效果。例如,p40和CCL-19保护的CAR-T细胞在较低剂量下表现出比相应的裸CAR-T细胞更高的效力。

[0322] 因此,在另一方面,本文提供了一种多肽,该多肽包含:本文提供的CAR,以及IL-12的p40亚基和CCL-19中的至少一种。在一些实施例中,本文提供了包含本文提供的CAR和p40的多肽。在一些实施例中,本文提供了包含本文提供的CAR和CCL-19的多肽。在其他实施例中,本文提供了包含本文提供的CAR以及p40和CCL-19的多肽。在一些实施例中,p40是包含

SEQ ID NO:135的氨基酸序列的人p40,和/或CCL-19是包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的人CCL-19。

[0323] 在本发明的多肽中,CAR、p40和/或CCL-19可以按任何顺序排列。例如,在其中CAR、p40和CCL-19均存在于多肽中的情况下,在一些实施例中,本文提供的多肽从N末端到C末端包含:CAR、p40和CCL-19;在一些实施例中,本文提供的多肽从N末端到C末端包含:CAR、CCL-19和p40;在一些实施例中,本文提供的多肽从N末端到C末端包含:CCL-19、p40和CAR;在一些实施例中,本文提供的多肽从N末端到C末端包含:p40、CCL-19和CAR;在一些实施例中,本文提供的多肽从N末端到C末端包含:p40、CAR和CCL-19;并且在一些实施例中,本文提供的多肽从N末端到C末端包含:CCL-19、CAR和p40。

[0324] 在本文提供的各种多肽的一些实施例中,CAR、p40和/或CCL-19通过肽接头彼此连接。在一些实施例中,肽接头是自切割肽,诸如2A自切割肽,使得CAR、p40和/或CCL-19在细胞中切割后变成单独的多肽。2A肽的成员以首次描述它们的病毒命名。例如,首次描述的2A肽F2A源自口蹄疫病毒。自切割18-22个氨基酸长的2A肽介导脯氨酸与甘氨酸残基之间的“核糖体跳跃”并抑制肽键形成而不影响下游翻译。这些肽允许多种蛋白编码为多蛋白,这些多蛋白在翻译时解离成组分蛋白。自切割肽存在于小核糖核酸病毒科病毒家族的成员中,包括口蹄疫病毒,诸如口蹄疫病毒(FMDV)、马鼻炎A型病毒(ERAV)、明脉扁刺蛾病毒(TaV)和猪捷申病毒-1(PTV-1)(参见Donnelly等人,J.Gen.Virol.,82:1027-101(2001);Ryan等人,J.Gen.Virol.,72:2727-2732(2001)),以及心脏病毒,诸如泰勒病毒(例如,泰勒鼠脑脊髓炎)和脑心肌炎病毒。源自FMDV、ERAV、PTV-1和TaV的2A肽有时分别称为“F2A”、“E2A”、“P2A”和“T2A”,并且包括在本披露内容中,例如,如以下文献中所述:Donnelly等人,J.Gen.Virol.,78:13-21(1997);Ryan和Drew,EMBO J.,13:928-933(1994);Szymczak等人,Nature Biotech.,5:589-594(2004);Hasegawa等人,Stem Cells,25(7):1707-12(2007)。在其他实施例中,本文使用内含肽介导的蛋白剪接系统,如Shah和Muir,Chem Sci.,5(1):446-461(2014)以及Topilina和Mills,Mobile DNA,5(5)(2014)中所述。本领域已知的其他方法也可用于本发明的构建体。

[0325] 在一些实施例中,2A自切割肽选自自由F2A、E2A、P2A、T2A或其变体组成的组。在一些实施例中,自切割肽是包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的2A自切割肽P2A片段。在具体的实施例中,自切割肽是包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的T2A片段。

[0326] 在一些具体的实施例中,p40和CCL-19通过第一自切割肽连接。在一些实施例中,第一自切割肽是包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的19自切割肽T2A片段。在一些实施例中,本文提供的包含IL-12的p40亚基和CCL-19的结构域包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR通过第二自切割肽连接到结构域。在一些实施例中,第二自切割肽是包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的2A自切割肽P2A片段。在具体的实施例中,本文提供的CAR包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列。

[0327] 在另一方面,本文提供了编码上述多肽的核酸,该多肽包含本文提供的CAR、IL-12的p40亚基和/或CCL-19。

5.3.8. 示例性CAR

[0328] 示例性CAR的生成如下文第6部分所示。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列或由SEQ ID NO:91的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提

供了包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列或由SEQ ID NO:92的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列或由SEQ ID NO:93的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列或由SEQ ID NO:94的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列或由SEQ ID NO:95的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列或由SEQ ID NO:96的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列或由SEQ ID NO:97的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列或由SEQ ID NO:98的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列或由SEQ ID NO:99的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列或由SEQ ID NO:100的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列或由SEQ ID NO:107的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列或由SEQ ID NO:108的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列或由SEQ ID NO:109的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列或由SEQ ID NO:110的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列或由SEQ ID NO:111的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列或由SEQ ID NO:112的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列或由SEQ ID NO:113的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列或由SEQ ID NO:114的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列或由SEQ ID NO:115的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列或由SEQ ID NO:116的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列或由SEQ ID NO:130的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列或由SEQ ID NO:131的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施例中,本文提供了包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列或由SEQ ID NO:133的氨基酸序列组成的CAR。

[0329] 在某些实施例中,本文提供的CAR包含相对于以下第6部分中示例的CAR中的任何一种具有一定百分比同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,本文提供了包含与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽的GPC3 CAR。在一些实施例中,本文提供了包含与SEQ ID NO:92的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽的GPC3 CAR。在一些实施例中,本文提供了包含与SEQ ID NO:93的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽的GPC3 CAR。在一些实施例中,本文提供了包含与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽的GPC3 CAR。在一些实施例中,本文提供了包含与SEQ ID NO:95的氨基酸序列具有至少75%、80%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽的GPC3 CAR。在一些实施例中,本文提供了包含与SEQ ID NO:131的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽的GPC3 CAR。在一些实施例中,本文提供了包含与SEQ ID NO:133的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽的GPC3 CAR。

[0330] 在一些实施例中,本文提供了编码本文提供的任何GPC3 CAR的分离的核酸。下文提供了关于核酸序列和载体的更详细描述。

5.4. 工程化免疫效应细胞

[0331] 在其他方面,本文提供了包含本文所述的CAR中的任一种的宿主细胞(诸如免疫效应细胞)。

[0332] 因此,在一些实施例中,本文提供了包含CAR的工程化免疫效应细胞(诸如T细胞),该CAR包含多肽,该多肽包含:(a)细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域包含一种或多种抗GPC3抗体;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域,其中该抗GPC3抗体是如上文第5.2部分中所述的抗GPC3抗体,包括例如包含表3和表4中的一种或多种CDR的那些,并且更具体地,在一些实施例中,抗GPC3抗体(例如scFv)包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的LCDR3,或(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的LCDR3,或(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的LCDR3,或(iv)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的LCDR3,或(v)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的LCDR3,或(vi)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的LCDR3,或(vii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的LCDR3,或(viii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCDR2

和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的LCDR3,或(ix)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的LCDR3,或(x)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施例中,在本发明免疫效应细胞中表达的CAR中的抗体(例如scFv)包含选自SEQ ID NO:61-70和117-122的组的VH结构域和选自SEQ ID NO:71-80和123-125的组的VL结构域。在更具体的实施例中,本发明免疫效应细胞的CAR中的抗体是包含与SEQ ID NO:81-90、128和129中任一个的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的scFv。在一些实施例中,跨膜结构域选自由CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组。在一些实施例中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(诸如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该初级细胞内信号传导结构域源自CD3 ζ 。在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施例中,共刺激信号传导结构域源自选自由CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合组成的组的共刺激分子。在一些实施例中,CAR进一步包含位于细胞外抗原结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域(诸如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施例中,CAR进一步包含位于多肽的N-末端的信号肽(诸如CD8 α 信号肽)。在一些实施例中,多肽从N-末端到C-末端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、源自CD137的共刺激信号传导结构域和源自CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0333] 在其他具体的实施例中,本文提供了包含CAR的工程化免疫效应细胞(诸如T细胞),该CAR包含多肽,该多肽包含SEQ ID NO:91-100、107-116和130-131的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:91-100、107-116和130-131的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0334] 在一些实施例中,工程化免疫效应细胞是T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞或胚胎干细胞。在一些实施例中,工程化免疫效应细胞是自体的。在一些实施例中,工程化免疫效应细胞是同种异体的。

[0335] 还提供了包含(或表达)两种或更多种不同CAR的工程化免疫效应细胞。本文所述的任何两种或更多种CAR可以组合表达。CAR可以靶向不同的抗原,从而提供协同或累加效应。两种或更多种CAR可以在相同的载体或不同的载体上编码。

[0336] 工程化免疫效应细胞可以进一步表达一种或多种治疗性蛋白和/或免疫调节剂,诸如免疫检查点抑制剂。参见例如国际专利申请号PCT/CN 2016/073489和PCT/CN 2016/087855,其通过援引以其全文并入本文。

5.4.1. 载体

[0337] 本披露提供了用于克隆和表达本文所述的CAR中的任一种的载体。在一些实施例中,载体适于在真核细胞诸如哺乳动物细胞中复制和整合。在一些实施例中,载体是病毒载

体。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、牛痘载体、单纯疱疹病毒载体及其衍生物。病毒载体技术是本领域熟知的,并且描述于例如Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)以及其他病毒学和分子生物学手册中。

[0338] 已经开发了用于将基因转移到哺乳动物细胞中的许多基于病毒的系统。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了便利的平台。可以使用本领域已知的技术将异源核酸插入载体中并包装在逆转录病毒粒子中。然后可以分离重组病毒,并在体外或离体将其递送至工程化哺乳动物细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施例中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一些实施例中,使用慢病毒载体。在一些实施例中,使用自灭活的慢病毒载体。例如,携带免疫调节剂(诸如免疫检查点抑制剂)编码序列的自灭活慢病毒载体和/或携带嵌合抗原受体的自灭活慢病毒载体可以用本领域已知的方案包装。可以使用本领域已知的方法,将所得的慢病毒载体用于转导哺乳动物细胞(例如,原代人T细胞)。源自逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期、稳定整合及其在子代细胞中的繁殖。慢病毒载体还具有低免疫原性,并且可以转导非增殖细胞。

[0339] 在一些实施例中,载体包含编码本文所述的CAR的核酸中的任一种。可以使用本领域任何已知的分子克隆方法将核酸克隆到载体中,包括例如使用限制性内切酶位点和一种或多种选择性标记。在一些实施例中,核酸可操作地连接到启动子。已经研究了用于哺乳动物细胞中的基因表达的多种启动子,并且本领域已知的任何启动子都可以用于本披露。启动子可大致分为组成型启动子或调节型启动子,例如诱导型启动子。

[0340] 在一些实施例中,编码CAR的核酸可操作地连接到组成型启动子。组成型启动子允许异源基因(也称为转基因)在宿主细胞中组成性地表达。本文考虑的示例性组成型启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)启动子、人延伸因子-1 α (hEF1 α)、泛素C启动子(UbiC)、磷酸甘油激酶启动子(PGK)、猿猴病毒40早期启动子(SV40)以及与CMV早期增强子偶联的鸡 β -肌动蛋白启动子(CAGG)。在许多研究中,已经广泛地比较了此类组成型启动子对驱动转基因表达的效率。例如,Michael C. Milone等人比较了CMV、hEF1 α 、UbiC和PGK驱动原代人T细胞中嵌合抗原受体表达的效率,并得出结论,hEF1 α 启动子不仅诱导了最高水平的转基因表达,并且最优地维持在CD4和CD8人T细胞中(*Molecular Therapy*, 17(8):1453-1464(2009))。在一些实施例中,编码CAR的核酸可操作地连接到hEF1 α 启动子。

[0341] 在一些实施例中,编码CAR的核酸可操作地连接到诱导型启动子。诱导型启动子属于调节型启动子的类别。诱导型启动子可以由一种或多种条件诱导,例如物理条件、工程化免疫效应细胞的微环境或工程化免疫效应细胞的生理状态、诱导物(即,诱导剂)或它们的组合。

[0342] 在一些实施例中,诱导条件不诱导工程化哺乳动物细胞和/或接受药物组合物的受试者中内源基因的表达。在一些实施例中,诱导条件选自由以下组成的组:诱导物、辐射(例如,电离辐射、光)、温度(例如,热)、氧化还原状态、肿瘤环境和工程化哺乳动物细胞的激活状态。

[0343] 在一些实施例中,载体还含有选择性标记基因或报告基因以从通过慢病毒载体转染的宿主细胞群中选择表达CAR的细胞。选择性标记和报告基因都可以侧接有适当的调控

序列,以使得能够在宿主细胞中表达。例如,载体可以含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调控核酸序列表达的启动子。

[0344] 在一些实施例中,载体包含多于一种编码CAR的核酸。在一些实施例中,载体包含含有编码第一CAR的第一核酸序列和编码第二CAR的第二核酸序列的核酸,其中第一核酸通过编码自切割肽的第三核酸序列与第二核酸可操作地连接。在一些实施例中,自切割肽选自T2A、P2A和F2A组成的组。

5.4.2. 免疫效应细胞

[0345] “免疫效应细胞”是指能发挥免疫效应子功能的免疫细胞。在一些实施例中,该免疫效应细胞至少表达Fc γ RIII,并且发挥ADCC效应子功能。介导ADCC的免疫效应细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞、中性粒细胞、和嗜酸性粒细胞。

[0346] 在一些实施例中,免疫效应细胞是T细胞。在一些实施例中,这些T细胞是CD4+/CD8-、CD4-/CD8+、CD4+/CD8+、CD4-/CD8-、或其组合。在一些实施例中,T细胞在表达CAR并与靶细胞(诸如GPC3+肿瘤细胞)结合后产生IL-2、TFN和/或TNF。在一些实施例中,CD8+T细胞在表达CAR并与靶细胞结合后裂解抗原特异性靶细胞。

[0347] 在一些实施例中,免疫效应细胞是NK细胞。在其他实施例中,免疫效应细胞可以是已建立的细胞系,例如NK-92细胞。

[0348] 在一些实施例中,免疫效应细胞是从干细胞(如造血干细胞、多能干细胞、iPS、或胚胎干细胞)分化而来的。

[0349] 工程化免疫效应细胞通过将CAR引入免疫效应细胞诸如T细胞来制备。在一些实施例中,通过转染任何一种分离的核酸或任何一种上述载体将CAR引入免疫效应细胞。在一些实施例中,通过将蛋白插入细胞膜中同时使细胞通过微流体体系(诸如CELL SQUEEZE[®]),将CAR引入免疫效应细胞(参见例如美国专利申请公开号20140287509)。

[0350] 将载体或分离的核酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域已知的。所描述的载体可以通过物理、化学或生物方法转移到免疫效应细胞中。

[0351] 将载体引入免疫效应细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。产生含有载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域熟知的。参见例如 Sambrook等人(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。在一些实施例中,通过电穿孔将载体引入细胞中。

[0352] 将载体引入免疫效应细胞的生物方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体已成为用于将基因插入哺乳动物例如人细胞的最广泛使用的方法。

[0353] 用于将载体引入免疫效应细胞的化学方法包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊泡)。

[0354] 在一些实施例中,编码本文所述的任何CAR的RNA分子可以通过常规方法(例如体外转录)制备,然后通过已知方法诸如mRNA电穿孔引入免疫效应细胞中。参见例如 Rabinovich等人,Human Gene Therapy 17:1027-1035(2006)。

[0355] 在一些实施例中,将转导的或转染的免疫效应细胞在引入载体或分离的核酸后离体增殖。在一些实施例中,将转导的或转染的免疫效应细胞培养以繁殖至少约1天、2天、3

天、4天、5天、6天、7天、10天、12天或14天中的任一个。在一些实施例中,进一步评估或筛选转导或转染的免疫效应细胞以选择工程化哺乳动物细胞。

[0356] 报告基因可用于鉴定可能转染的细胞和评估调控序列的功能。通常,报告基因是在受体生物体或组织中不存在或不表达的基因,该报告基因编码多肽,该多肽的表达通过一些易于检测的特性(例如,酶活性)来表现。报告基因的表达在DNA被引入受体细胞后的合适的时间检测。合适的报告基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌性碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等人FEBS Letters 479:79-82 (2000))。合适的表达系统是熟知的,并且可以使用已知技术制备或从商业上获得。

证实工程化免疫效应细胞中存在编码CAR的核酸的其他方法包括例如本领域技术人员熟知的分子生物学测定,例如DNA印迹法和RNA印迹法、RT-PCR和PCR;生物化学测定,例如通过免疫学方法(例如,ELISA和蛋白印迹)来检测特定肽的存在或不存在。

5.4.3. T细胞来源

[0357] 在一些实施例中,在对T细胞进行扩增和基因修饰之前,从受试者获得T细胞来源。T细胞可以获得自许多来源,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施例中,可以使用本领域可用的多种T细胞系。在一些实施例中,可以使用本领域技术人员已知的多种技术(例如,Ficoll™分离)来从受试者收集的血液中获得T细胞。在一些实施例中,来自个体循环血的细胞是通过单采(apheresis)获得的。单采产物典型地含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一些实施例中,可以洗涤通过单采收集的细胞以除去血浆级分,并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中用于后续处理步骤。在一些实施例中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施例中,洗涤溶液缺乏钙,并且可能缺乏镁,或可能缺乏许多(如果不是全部)二价阳离子。在不存在钙的情况下的初始激活步骤可以导致放大的激活。本领域的普通技术人员很容易理解,洗涤步骤可以通过本领域已知的方法完成,如根据制造商的说明使用半自动化“流动”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)。洗涤后,可将细胞重悬于各种生物相容性缓冲液中,例如像无Ca²⁺、无Mg²⁺的PBS,勃脉力A(PlasmaLyte A)或者含或不含缓冲液的其他盐水溶液。替代性地,可以除去单采样品的不良组分,并将细胞直接重悬浮于培养基中。

[0358] 在一些实施例中,通过例如,通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析来裂解红细胞并且消耗单核细胞来从外周血淋巴细胞分离T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离T细胞的特定亚群,如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞。例如,在一些实施例中,通过与抗CD3/抗CD28(即,3×28)缀合的珠(如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T)孵育足以对所需的T细胞进行阳性选择的一段时间而分离T细胞。在一些实施例中,该时间段为约30分钟。在另一个实施例中,该时间段为30分钟至36小时或更长以及其间的所有整数值。在另一个实施例中,该时间段为至少1、2、3、4、5或6小时。在一些实施例中,该时间段为10到24小时。在一些实施例中,该孵育时间段为24小时。对于白血病患者的T细胞的分离,使用较长的孵育时间(如24小时)可以增加细胞产量。与其他细胞类型相比,在T细胞较少的任何情况下,如在从肿瘤组织或免疫受损个体中分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的情况下,可以使用较长的孵育时间来分离T细胞。此外,使用较长的孵育时间可以增加CD8

+T细胞的捕获效率。因此,在一些实施例中,通过简单地缩短或延长允许T细胞与CD3/CD28珠结合的时间和/或增加或减少珠与T细胞的比率,可以在培养开始时或在培养过程中的其他时间点优先选择或不选择T细胞的亚群。另外地,通过增加或减小珠或其他表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养开始时或其他所需的时间点优先选择或不选择T细胞的亚群。本领域的技术人员会认识到,也可以使用多轮选择。在一些实施例中,可能希望进行选择过程,并在激活和扩增过程中使用“未选择的”细胞。“未选择的”细胞也可以进行新一轮的选择。

[0359] 通过阴性选择富集T细胞群可以通过结合针对阴性选择细胞特有的表面标记的抗体来实现。一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,该方法使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施例中,可能希望富集或阳性选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺和FoxP3⁺的调节性T细胞。替代性地,在某些实施例中,通过抗C25缀合的珠或其他类似的选择方法消耗T调节性细胞。

[0360] 为了通过阳性或阴性选择而分离所需的细胞群,可以改变细胞和表面(例如,粒子(如珠))的浓度。在某些实施例中,可能希望显著减少珠和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一个实施例中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施例中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施例中,使用大于1亿个细胞/ml。在另一个实施例中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在其他实施例中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在其他实施例中,可以使用1.25或1.50亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致细胞产量、细胞激活和细胞扩增增加。此外,使用高浓度的细胞可允许更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞(如CD28阴性T细胞)、或来自存在许多肿瘤细胞的样品(即,白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。此类细胞群可能具有治疗价值,并且期望能够获得。在一些实施例中,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0361] 在一些实施例中,可能需要使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如,颗粒,诸如珠)的混合物,使颗粒与细胞之间的相互作用最小化。这选择了表达大量结合颗粒的所需抗原的细胞。例如,CD4⁺T细胞表达更高水平的CD28,并且比稀释浓度的CD8⁺T细胞更有效地被捕获。在一些实施例中,使用的细胞的浓度为 5×10^6 个/ml。在一些实施例中,使用的浓度可以为约 1×10^5 个/ml至 1×10^6 个/ml,以及介于两者之间的任何整数值。

[0362] 在一些实施例中,细胞可以在旋转器上以不同的速度在2°C-10°C或在室温下孵育不同的时间长度。

[0363] 用于刺激的T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻。不受理论的束缚,冷冻和随后的解冻步骤可以通过去除细胞群中的粒细胞和在某种程度上去除单核细胞来提供更均匀的产物。在除去血浆和血小板的洗涤步骤之后,可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的并且在这种情况下是有用的,但是一种方法涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5% DMSO,或31.25% plasmalyte-A、31.25%右旋糖5%、0.45% NaCl、10%葡聚糖40和5%

右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基,或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其他合适的细胞冷冻培养基。然后将细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80°C并储存在液氮储存罐的气相中。可以使用其他受控冷冻方法以及立即在-20°C或在液氮中的不受控冷冻。

[0364] 在一些实施例中,如本文所述将冷冻保存的细胞解冻和洗涤,并在激活前在室温下静置一小时。

[0365] 在本披露中还考虑了在可能需要如本文所述的扩增的细胞之前的时间段从受试者收集血液样品或单采产物。因此,可以在任何必要的时间点收集待扩增的细胞来源,并分离和冷冻所需的细胞,诸如T细胞,以随后在T细胞疗法中用于将受益于T细胞疗法的多种疾病或病状,诸如本文所述的那些。在一个实施例中,血液样品或单采血液成分取自一般健康受试者。在某些实施例中,血液样品或单采血液成分取自处于患疾病风险但尚未患疾病的一般健康受试者,并且分离并冷冻目的细胞以备后用。在某些实施例中,T细胞可以扩增、冷冻并在以后使用。在某些实施例中,在诊断如本文所述的特定疾病之后不久但在任何治疗之前从患者收集样品。在另一个实施例中,在多种相关治疗模式之前从受试者的血液样品或单采血液成分分离细胞,这些相关治疗模式包括但不限于用药剂诸如那他珠单抗、依法珠单抗、抗病毒剂、化学疗法、辐射、免疫抑制剂(诸如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体或其他免疫清除剂(immunoablative agent)(诸如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷酰胺、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228)和照射进行治疗。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导很重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu等人,Cell66:807-815(1991); Henderson等人,Immun 73:316-321(1991); Bierer等人,Curr.Opin.Immun.5:763-773(1993))。在另一个实施例中,分离患者的细胞并将其冷冻以供随后与骨髓或干细胞移植、使用化学治疗剂(诸如氟达拉滨)的T细胞清除疗法、外部光束辐射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体(诸如OKT3或CAMPATH)结合使用(例如,之前、同时或之后)。

[0366] 在一些实施例中,在治疗或直接从患者中获得T细胞。在这方面,已经观察到,在某些癌症治疗后,特别是用损害免疫系统的药物治疗后,在当患者通常从治疗中恢复的时期,治疗后不久,获得的T细胞的质量可能是最佳的,或改善其离体扩展的能力。同样,在使用本文所述方法进行离体操作后,这些细胞可以处于增强植入和体内扩增的优选状态。因此,在本披露的上下文中预期在该恢复阶段收集血细胞,包括T细胞、树突状细胞、或其他造血系的细胞。此外,在某些实施例中,动员(例如,用GM-CSF动员)和调理方案可用于在受试者中创造条件,其中特别是在治疗后定义的时间窗口期间,有利于细胞类型的再填充、再循环、再生和/或扩展。说明性的细胞类型包括T细胞、B细胞、树突状细胞、和免疫系统的其他细胞。

5.4.4. T细胞的激活和扩增

[0367] 在一些实施例中,在用本文所述的CAR对T细胞进行基因修饰之前或之后,通常可以使用例如美国专利号6,352,694、6,534,055、6,905,680、6,692,964、5,858,358、6,887,466、6,905,681、7,144,575、7,067,318、7,172,869、7,232,566、7,175,843、5,883,223、6,905,874、6,797,514、6,867,041以及美国专利申请公开号20060121005中所述的方法来激活和扩增T细胞。

[0368] 通常,可以通过与附着有刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞表面上

的共刺激分子的配体的表面接触来扩增T细胞。特别地,可以如本文所述诸如通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或通过与钙离子载体结合的蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑素)来刺激T细胞群。为了共刺激T细胞表面的辅助分子,可使用结合辅助分子的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,可以将T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,可使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD3抗体的实例包括UCHT1、OKT3、HIT3a (BioLegend, San Diego, US), 可以使用本领域通常已知的其他方法 (Graves J等人, *J. Immunol.* 146:2102 (1991); Li B等人, *Immunology* 116:487 (2005); Rivollier A等人, *Blood* 104:4029 (2004))。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28 (Diacclone, Besancon, France), 可以使用本领域通常已知的其他方法 (Berg等人, *Transplant Proc.* 30 (8):3975-3977 (1998); Haanen等人, *J. Exp. Med.* 190 (9):13191328 (1999); Garland等人, *J. Immunol Meth.* 227 (1-2):53-63 (1999))。

[0369] 在一些实施例中,T细胞的初级刺激信号和共刺激信号可以通过不同的方案提供。例如,提供每个信号的药剂可以在溶液中或与表面偶联。当与表面偶联时,药剂可以与同一表面偶联(即,以“顺式”形式)或与单独的表面偶联(即,以“反式”形式)。替代性地,一种药剂可以在溶液中与表面和另一种药剂偶联。在一个实施例中,提供共刺激信号的药剂与细胞表面结合,提供初级激活信号的药剂在溶液中或与表面偶联。在某些实施例中,两种药剂都可以在溶液中。在另一个实施例中,药剂可以是可溶形式,然后交联到表面,诸如表达Fc受体的细胞或抗体或其他将结合药剂的结合剂。在这方面,参见例如美国专利申请公开号20040101519和20060034810的人工抗原呈递细胞(aAPC),它们在本披露的某些实施例中被考虑用于激活和扩增T细胞。

[0370] 在一些实施例中,将T细胞与包被试剂的珠组合,随后分离珠和细胞,然后培养细胞。在另一个实施例中,在培养之前,不分离包被试剂的珠和细胞,而是将它们一起培养。在另一个实施例中,首先通过施加力诸如磁力来浓缩珠和细胞,导致细胞表面标记的连接增加,从而诱导细胞刺激。

[0371] 例如,细胞表面蛋白可以通过允许附着有抗CD3和抗CD28的顺磁珠(3×28珠)接触T细胞来连接。在一个实施例中,将细胞(例如,10⁴至4×10⁸个T细胞)和珠(例如,推荐滴度为1:100的抗CD3/CD28 MACSiBead颗粒)组合在缓冲液中,优选PBS(不含二价阳离子,诸如钙和镁)。本领域普通技术人员可以容易地理解,可以使用任何细胞浓度。例如,靶细胞在样品中可能非常少,并且仅占样品的0.01%,或者整个样品(即100%)可以包含目的靶细胞。因此,任何细胞数目都在本披露的范围内。在某些实施例中,可能希望显著减少颗粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,在一个实施例中,使用约20亿个细胞/mL的浓度。在另一个实施例中,使用大于1亿个细胞/mL。在另一个实施例中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/mL的细胞浓度。在其他实施例中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/mL的细胞浓度。在其他实施例中,可以使用1.25或1.50亿个细胞/mL的浓度。使用高浓度可导致细胞产量、细胞激活和细胞扩增增加。此外,使用高细胞浓度可以允许更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞,诸如CD28阴性T细胞。此类细胞群可以具有治疗价值,并且在某些实施例中期望能够获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱的CD28表达的CD8+T细胞。

[0372] 在一些实施例中,混合物可以培养数小时(约3小时)至约14天或两者之间的任何小时整数。在另一个实施例中,混合物可以培养21天。在一个实施例中,珠和T细胞一起培养约八天。在另一个实施例中,珠和T细胞一起培养2-3天。还可能几个刺激周期,使得T细胞的培养时间可以是60天或更长。适于T细胞培养的条件包括合适的培养基(例如,最低限度必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15 (Lonza)),其可以含有增殖和活力所必需的因子,包括血清(例如,胎牛血清或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加剂。其他用于细胞生长的添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉和还原剂,诸如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-vivo 15和X-vivo 20、优化剂,添加有氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充有适当量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或足以生长和扩增T细胞的量的细胞因子。抗生素(例如青霉素和链霉素)仅包含在实验培养物中,而不包含在待输注到受试者体内的细胞培养物中。将靶细胞维持在支持生长所必需的条件,例如适当的温度(例如37 $^{\circ}$ C)和气氛(例如空气加5%CO₂)。已经暴露于不同刺激时间的T细胞可以表现出不同的特征。例如,典型的血液或单采血液成分的外周血单核细胞产物具有比细胞毒性或抑制性T细胞群(TC、CD8)更多的辅助T细胞群(TH、CD4⁺)。通过刺激CD3和CD28受体进行的T细胞离体扩增产生T细胞群,该T细胞群在约第8-9天之前主要由TH细胞组成,而在约第8-9天之后,T细胞群包含越来越多的TC细胞群。因此,根据治疗目的,用主要包含TH细胞的T细胞群输注受试者可能是有利的。类似地,如果分离了TC细胞的抗原特异性亚群,则在更大程度上扩增该亚群可能是有益的。

[0373] 此外,除了CD4和CD8标记之外,其他表型标记也有显著差异,但在很大程度上,在细胞扩增过程中可再现。因此,这种再现性使得能够为特定目的定制激活的T细胞产品。

5.4.5. 表达外源引入的p40和CCL-19的CAR-T细胞

[0374] 在某些实施例中,本文提供的T细胞进一步表达外源引入的p40和CCL-19。如上文和下文第6部分所述,这种CAR-T细胞令人惊讶地表现出优异的效果。

[0375] 这种CAR-T细胞可以通过将上文第5.3.7部分中描述的多肽引入T细胞来产生。

[0376] 更具体地,在一些实施例中,表达外源引入的p40和CCL-19的CAR-T细胞可以通过引入一种或多种编码第5.3.7部分中描述的多肽的核酸来产生。

[0377] CAR、p40和CCL-19可以各自作为单独的多肽单独引入T细胞中。例如,将编码本文提供的CAR的核酸、编码p40的核酸和编码CCL-19的核酸分别引入T细胞中。

[0378] 替代性地,三者中的任何两者或它们中的所有三者可以通过一种核酸一起作为单一多肽引入T细胞中,该核酸将在细胞中翻译时裂解。例如,将编码包含本文提供的CAR和通过自切割肽接头连接的p40的多肽的核酸引入T细胞中,并单独地将编码CCL-19的核酸引入T细胞中。类似地,将编码包含本文提供的CAR和通过自切割肽接头连接的CCL-19的多肽的核酸引入T细胞中,并单独地将编码p40的核酸引入T细胞中。在一些实施例中,可以将编码包含通过自切割肽接头彼此连接的CAR、p40和CCL-19中的所有三者的多肽的核酸引入T细胞中。上文更详细地描述了自切割肽接头。在一些实施例中,2A自切割肽选自由F2A、E2A、P2A、T2A或其变体组成的组。在一些实施例中,自切割肽是包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的2A自切割肽P2A片段。在具体的实施例中,自切割肽是包含SEQ ID NO:139的氨基酸序

列的T2A片段。

[0379] 替代性地,本文提供的CAR-T细胞可以由包含多个区域的多核苷酸产生,例如编码CAR的区域、编码p40的区域和/或编码CCL-19的区域。不同的区域可以由相同的启动子控制。例如,在一些实施例中,本文使用内部核糖体进入位点(IRES)来表达来自一个启动子的多个基因。在其他实施例中,不同的区域由单独的启动子控制。

[0380] 除其他特性外,表达外源引入的p40和CCL-19的CAR-T细胞与没有外源引入的p40和CCL-19的CAR-T细胞相比具有更高水平的IL-23。在一些实施例中,IL-23的水平高至少20%。在一些实施例中,IL-23的水平高至少50%。在一些实施例中,IL-23的水平高至少80%。

5.5. 多核苷酸

[0381] 在某些实施例中,本披露提供了编码结合GPC3的本发明抗体的多核苷酸和包含结合本文所述GPC3的抗体的融合蛋白。本披露的多核苷酸可以是RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链或单链,并且如果是单链,则可以是编码链或非编码(反义)链。在一些实施例中,多核苷酸是cDNA的形式。在一些实施例中,多核苷酸是合成多核苷酸。

[0382] 在某些实施例中,本披露提供了编码本文提供的GPC3 CAR的多核苷酸。本披露的多核苷酸可以是RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链或单链,并且如果是单链,则可以是编码链或非编码(反义)链。在一些实施例中,多核苷酸是cDNA的形式。在一些实施例中,多核苷酸是合成多核苷酸。

[0383] 本披露进一步涉及本文所述的多核苷酸的变体,其中该变体编码例如结合本披露的GPC3的抗体或CAR的片段、类似物和/或衍生物。在某些实施例中,本披露提供了一种多核苷酸,该多核苷酸包含具有与编码结合本披露的GPC3的抗体或CAR的多核苷酸至少约75%相同、至少约80%相同、至少约85%相同、至少约90%相同、至少约95%相同、并且在一些实施例中至少约96%、97%、98%或99%相同的核苷酸序列的多核苷酸。如本文所用,短语“具有与参考核苷酸序列至少例如95%“相同”的核苷酸序列的多核苷酸”旨在表示除了以下方面外,该多核苷酸的核苷酸序列与参考序列相同:在该参考核苷酸序列的每100个核苷酸中,该多核苷酸序列可以包括最多五个点突变。换句话说,为了获得具有与参考核苷酸序列具有至少95%同一性的核苷酸序列的多核苷酸,可以删除或用另一个核苷酸取代参考序列中多达5%的核苷酸,或者可将参考序列中多达总核苷酸的5%的多个核苷酸插入参考序列中。参考序列的这些突变可发生在参考核苷酸序列的5'或3'末端位置或那些末端位置之间的,散布在参考序列中的单个核苷酸之间或在参考序列内的一个或多个连续基团中的任何地方。

[0384] 多核苷酸变体可以在编码区、非编码区或两者中含有改变。在一些实施例中,多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失但不改变编码的多肽的性质或活性的改变。在一些实施例中,多核苷酸变体包含沉默取代,其不导致多肽的氨基酸序列的改变(由于遗传密码的简并性)。可以出于多种原因产生多核苷酸变体,例如,为了优化特定宿主的密码子表达(即,将人mRNA中的密码子改变为细菌宿主如大肠杆菌所偏好的那些)。在一些实施例中,多核苷酸变体在序列的非编码或编码区中包含至少一个沉默突变。

[0385] 在一些实施例中,产生了多核苷酸变体以调节或改变编码的多肽的表达(或表达

水平)。在一些实施例中,产生了多核苷酸变体以增加编码的多肽的表达。在一些实施例中,产生了多核苷酸变体以减少编码的多肽的表达。在一些实施例中,与亲本多核苷酸序列相比,多核苷酸变体具有增加的编码的多肽的表达。在一些实施例中,与亲本多核苷酸序列相比,多核苷酸变体具有减少的编码的多肽的表达。

[0386] 还提供了包含本文所述的核酸分子的载体。在一个实施例中,可以将核酸分子掺入重组表达载体中。本披露提供了包含本披露的任何核酸的重组表达载体。如本文所用,术语“重组表达载体”是指基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当该构建体包含编码 mRNA、蛋白、多肽或肽的核苷酸序列,并且载体在足以使 mRNA、蛋白、多肽或肽在细胞内表达的条件下与细胞接触时,允许 mRNA、蛋白、多肽或肽通过宿主细胞表达。本文所述的载体整体上不是天然存在的;然而,部分载体可以是天然存在的。所描述的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于 DNA 和 RNA,它们可以是单链或双链的、合成的或部分从天然来源获得,并且可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在的或非天然存在的核苷酸间键,或两种类型的键。非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间键不阻碍载体的转录或复制。

[0387] 在一个实施例中,本披露的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于增殖和扩增或用于表达或两者兼有的载体,诸如质粒和病毒。载体可以选自由 pUC 系列 (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Md.)、pBluescript 系列 (Stratagene, La Jolla, Calif.)、pET 系列 (Novagen, Madison, Wis.)、pGEX 系列 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 和 pEX 系列 (Clontech, Palo Alto, Calif.) 组成的组。可以使用噬菌体载体,诸如 λ GT10、 λ GT11、 λ EMBL4、 λ NM1149 和 λ ZapII (Stratagene)。植物表达载体的实例包括 pBI01、pBI01.2、pBI121、pBI101.3 和 pBIN19 (Clontech)。动物表达载体的实例包括 pEUK-C1、pMAM 和 pMAMneo (Clontech)。重组表达载体可以是病毒载体,例如逆转录病毒载体,例如 γ 逆转录病毒载体。

[0388] 在一个实施例中,使用例如上述 Sambrook 等人 和 上述 Ausubel 等人 中描述的标准重组 DNA 技术制备重组表达载体。可以制备环状或线性表达载体的构建体以包含在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。复制系统可以源自例如 ColE1、SV40、2 μ 质粒、 λ 、牛乳头状瘤病毒等。

[0389] 重组表达载体可以包含调控序列,诸如转录和翻译起始和终止密码子,它们对载体待引入的宿主类型(例如细菌、植物、真菌或动物)是特异性的,视情况而定,并考虑载体是基于 DNA 还是基于 RNA。

[0390] 重组表达载体可以包括一个或多个标记基因,其允许选择转化的或转染的宿主。标记基因包括杀生物剂抗性,例如对抗生素、重金属等的抗性,在营养缺陷型宿主中互补以提供原养型等。所述表达载体的合适标记基因包括例如新霉素/G418 抗性基因、组氨酸^x抗性基因、组氨酸抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0391] 重组表达载体可以包含可操作地连接到本披露的核苷酸序列的天然或非天然启动子。启动子的选择,例如强启动子、弱启动子、组织特异性启动子、诱导型启动子和发育特异性启动子,在本领域技术人员的普通技能范围内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在本领域技术人员的技能范围内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒 (CMV) 启动子、RSV 启动子、SV40 启动子或在鼠干细胞病毒的长末端重复中发现的启动

子。

[0392] 重组表达载体可以设计用于瞬时表达、稳定表达或两者兼有。此外，可以制备重组表达载体用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0393] 此外，可以使重组表达载体包括自杀基因。如本文所用，术语“自杀基因”是指导致表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是赋予表达该基因的细胞对药剂例如药物的敏感性的基因，并且当细胞与药剂接触或暴露于药剂时导致细胞死亡。自杀基因是本领域已知的，并且包括例如单纯疱疹病毒 (HSV) 胸苷激酶 (TK) 基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基还原酶。

[0394] 在某些实施例中，多核苷酸是分离的。在某些实施例中，多核苷酸是基本上纯的。

[0395] 还提供了包含本文所述的核酸分子的宿主细胞。宿主细胞可以是任何含有异源核酸的细胞。异源核酸可以是载体 (例如，表达载体)。例如，宿主细胞可以是来自任何生物体的细胞，以任何方式选择、修饰、转化、生长、使用或操纵的，用于通过细胞产生物质，例如通过细胞表达基因、DNA或RNA序列、蛋白或酶。可以确定适当的宿主。例如，可以基于载体骨架和所需结果来选择宿主细胞。例如，可以将质粒或粘粒引入原核宿主细胞中以复制几种类型的载体。细菌细胞诸如但不限于DH5 α 、JM109和KCB、SURE®感受态细胞和SOLOPACK Gold细胞可用作载体复制和/或表达的宿主细胞。另外，细菌细胞诸如大肠杆菌LE392可用作噬菌体病毒的宿主细胞。可用作宿主细胞的真核细胞包括但不限于酵母 (例如，YPH499、YPH500和YPH501)、昆虫和哺乳动物。用于复制和/或表达载体的哺乳动物真核宿主细胞的实例包括但不限于HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、COS、Saos、PC12、SP2/0 (美国典型培养物保藏中心 (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581)、NS0 (欧洲细胞培养物保藏中心 (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503)、FO (ATCC CRL-1646) 和Ag653 (ATCC CRL-1580) 鼠细胞系。示例性人骨髓瘤细胞系是U266 (ATCC CRL-TIB-196)。其他有用的细胞系包括源自中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的细胞系，诸如CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD)、CHO-K1 (ATCC CRL-61) 或DG44。

5.6. 药物组合物

[0396] 在一方面，本披露还提供了包含抗体、包含抗体的结合分子或治疗分子或本披露的工程化免疫效应细胞的药物组合物。在一些实施例中，药物组合物包含治疗有效量的抗体、包含抗体的结合分子或治疗分子或本披露的工程化免疫效应细胞和药学上可接受的赋形剂。

[0397] 在一些实施例中，本文提供了包含治疗有效量的本文提供的抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0398] 在一些实施例中，本文提供了包含治疗有效量的包含本文提供的抗体的治疗分子 (诸如融合蛋白、免疫缀合物和多特异性结合分子) 和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0399] 在其他实施例中，本文提供了包含治疗有效量的包含本文提供的抗体的CAR和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0400] 在其他实施例中，本文提供了包含治疗有效量的本文提供的工程化免疫效应细胞和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0401] 在其他实施例中，本文提供了包含例如在载体中的治疗有效量的本文提供的核酸

和例如适合于基因治疗的药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0402] 在具体的实施例中,术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全或不完全))、载剂或媒介物。药物赋形剂可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。盐水溶液、葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体赋形剂。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,该组合物还可以含有少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释配制品等形式。合适的药物赋形剂的实例在Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)Mack Publishing Co.,Easton,PA中进行了描述。此类组合物将含有预防或治疗有效量的本文提供的活性成分,诸如以纯化形式,以及合适量的赋形剂,以提供适合施用于患者的形式。该配制品应适合于施用方式。

[0403] 在一些实施例中,赋形剂的选择部分地由特定细胞、结合分子和/或抗体和/或通过施用方法决定。因此,存在多种合适的配制品。

[0404] 通常,可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂、抗氧化剂,包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E、焦亚硫酸钠;防腐剂、等渗剂、稳定剂、金属络合物(例如Zn-蛋白络合物);螯合剂,诸如EDTA和/或非离子表面活性剂。

[0405] 缓冲剂可用于将pH控制在优化治疗效果的范围,特别是如果稳定性是pH依赖性的。适用于本披露的缓冲剂包括有机酸和无机酸及其盐。例如,柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。另外,缓冲液可以包含组氨酸和三甲胺盐,诸如Tris。

[0406] 可以添加防腐剂以延缓微生物生长。适用于本披露的防腐剂包括十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎卤(例如,氯、溴、碘)铵;苄索氯铵;硫柳汞;苯酚、丁基或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0407] 可以存在张力剂(有时称为“稳定剂”)以调节或维持组合物中液体的张力。当与大的带电生物分子诸如蛋白和抗体一起使用时,它们通常被称为“稳定剂”,因为它们可以与氨基酸侧链的带电基团相互作用,从而降低分子间和分子内相互作用的可能性。示例性张力剂包括多羟糖醇、三羟或更高级糖醇,诸如甘油、赤藓糖醇、阿糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0408] 另外的示例性赋形剂包括:(1)填充剂、(2)增溶剂、(3)稳定剂和(4)防止变性或粘附到容器壁的试剂。这种赋形剂包括:多羟糖醇(上文列举的);氨基酸,诸如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,诸如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌醇、肌醇糖、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环醇(例如肌醇)、聚乙二醇;含硫还原剂,诸如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量蛋白,诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其他免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;单糖(例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖);二糖(例如乳糖、麦芽糖、蔗糖);三糖,诸如棉子糖;以及多糖,诸如糊精或葡聚糖。

[0409] 可以存在非离子表面活性剂或去污剂(也称为“润湿剂”)以帮助溶解治疗剂以及保护治疗性蛋白免于搅动诱导的聚集,这也允许配制品暴露于剪切表面应力而不引起活性治疗蛋白或抗体的变性。合适的非离子表面活性剂包括例如聚山梨醇酯(20、40、60、65、80等)、泊洛沙姆(184、188等)、PLURONIC®多元醇、TRITON®、聚氧乙烯脱水山梨醇单醚(TWEEN®-20、TWEEN®-80等)、聚桂醇400、聚氧乙烯40硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60、单硬脂酸甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。可以使用的阴离子洗涤剂包括月桂基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。阳离子洗涤剂包括苯扎氯铵或苜索氯铵。

[0410] 为了使药物组合物用于体内施用,它们优选是无菌的。药物组合物可通过经无菌滤膜过滤而变得无菌。

可以通过无菌过滤膜过滤使药物组合物无菌。本文的药物组合物通常可以置于具有无菌入口的容器中,例如具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0411] 施用途径根据已知的和可接受的方法,诸如通过单次或多次推注或以合适的方式长时间输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、病灶内或关节内途径的注射或输注、局部施用、吸入或通过缓释或延释方式。

[0412] 在另一个实施例中,药物组合物可以作为控释或缓释系统提供。在一个实施例中,可以使用泵来实现控释或缓释(参见例如Sefton, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-40 (1987); Buchwald等人, Surgery 88:507-16 (1980); 以及Saudek等人, N. Engl. J. Med. 321:569-74 (1989))。在另一个实施例中,聚合物材料可用于实现预防或治疗剂(例如,如本文所述的融合蛋白)或本文提供的组合物的控释或缓释(参见例如Medical Applications of Controlled Release (Langer和Wise编辑, 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen和Ball编辑, 1984); Ranger和Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61-126 (1983); Levy等人, Science 228:190-92 (1985); During等人, Ann. Neurol. 25:351-56 (1989); Howard等人, J. Neurosurg. 71:105-12 (1989); 美国专利号5,679,377、5,916,597、5,912,015、5,989,463和5,128,326; PCT公开号WO 99/15154和WO 99/20253)。用于缓释配制品的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酞、聚(N-乙基吡咯烷酮)、聚(乙醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在一个实施例中,缓释配制品中使用的聚合物是惰性的、不含可浸出杂质、储存稳定、无菌且可生物降解的。在其他实施例中,可以将控释或缓释系统置于特定靶组织例如鼻道或肺附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson, Medical Applications of Controlled Release 第2卷, 115-38 (1984))。控释系统例如由Langer, Science 249:1527-33 (1990) 讨论。本领域技术人员已知的任何技术都可用于制备包含一种或多种如本文所述的药剂的缓释配制品(参见例如美国专利号4,526,938、PCT公开号WO 91/05548和WO 96/20698、Ning等人, Radiotherapy & Oncology 39:179-89 (1996); Song等人, PDAJ. of Pharma. Sci. & Tech. 50:372-97 (1995); Cleek等人, Pro. Int' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-54 (1997); 以及Lam等人, Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-60 (1997))。

[0413] 本文所述的药物组合物还可以根据所治疗的特定适应症的需要含有多于一种活

性化合物或活性剂。替代性地或另外,组合物可以包含细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞因子、免疫抑制剂或生长抑制剂。这些分子适当地以对预期目的有效的量组合存在。

[0414] 活性成分也可以包封在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,包封在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或包封在粗乳液中。这些技术披露于Remington's Pharmaceutical Sciences第18版中。

[0415] 各种组合物和递送系统是已知的并且可以与本文提供的治疗剂一起使用,该组合物和递送系统包括但不限于包封在脂质体、微粒、微胶囊中,能够表达本文提供的抗体或治疗分子的重组细胞,构建作为逆转录病毒载体或其他载体的一部分的核酸等。

[0416] 在一些实施例中,本文提供的药物组合物包含治疗或预防疾病或病症有效量的结合分子和/或细胞,诸如治疗有效量或预防有效量。在一些实施例中,治疗或预防功效通过定期评估治疗的受试者来监测。对于几天或更长的重复施用,取决于病状,重复进行治疗直至出现疾病症状的所需的遏制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以确定。

5.7. 方法和用途

[0417] 在另一方面,本文提供了使用本文提供的GPC3结合分子的方法和用途,这些GPC3结合分子包括抗GPC3抗体、嵌合抗原受体(CAR)和/或表达重组受体的工程化细胞。

5.7.1. 治疗方法和用途

[0418] 此类方法和用途包括治疗方法和用途,例如,涉及将分子、细胞或含有它们的组合物施用于患有表达GPC3或与GPC3表达相关的疾病、病状或病症和/或其中细胞或组织表达GPC3的受试者。在一些实施例中,分子、细胞和/或组合物以有效量施用以实现疾病或病症的治疗。用途包括抗体和细胞在这些方法和治疗中的用途,以及在制备药物以进行这些治疗方法中的用途。在一些实施例中,这些方法通过将抗体或细胞或包含这些抗体或细胞的组合物施用于患有或怀疑患有疾病或病状的受试者来进行。在一些实施例中,这些方法由此治疗受试者的疾病或病症。

[0419] 在一些实施例中,本文提供的治疗导致疾病或病症或与其相关的症状、副作用或结果或表型的完全或部分改善或减少。治疗的理想效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓解症状、减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或减轻疾病状态以及缓解或改善预后。这些术语包括但不暗示完全治愈疾病或完全消除任何症状或对所有症状或结果的一个或多个影响。

[0420] 如本文所用,在一些实施例中,本文提供的治疗延迟疾病或病症的发展,例如延缓、阻碍、减缓、阻滞、稳定、抑制和/或推迟疾病(诸如癌症)的发展。该延迟可以具有不同的时间长度,其取决于疾病的历史和/或被治疗的个体。如本领域技术人员显而易见的,充分或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体没有患上疾病或病症。例如,可能延迟晚期癌症(例如转移的发展)。在其他实施例中,本文提供的方法或用途预防疾病或病症。

[0421] 在一些实施例中,疾病或病症是GPC3相关的疾病或病症。在一些实施例中,疾病或病症是GPC3阳性癌症,即表达或过表达GPC3的癌症。GPC3阳性癌症的实例包括但不限于HCC、黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌(诸如产生甲胎

蛋白的胃癌)、结肠直肠癌、食道癌和甲状腺癌。在一些实施例中,疾病或病症是HCC。在一些实施例中,疾病或病症是黑色素瘤。在一些实施例中,疾病或病症是卵巢透明细胞癌。在一些实施例中,疾病或病症是卵黄囊瘤(YST)。在一些实施例中,疾病或病症是成神经细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是肝母细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)。在一些实施例中,疾病或病症是肺鳞状细胞癌。在一些实施例中,疾病或病症是肺腺癌。在一些实施例中,疾病或病症是大细胞肺癌。在一些实施例中,疾病或病症是小细胞肺癌。在一些实施例中,疾病或病症是睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是脂肪肉瘤。在一些实施例中,疾病或病症是宫颈上皮内瘤变。在一些实施例中,疾病或病症是肾上腺腺瘤。在一些实施例中,疾病或病症是神经鞘瘤。在一些实施例中,疾病或病症是胚胎性肿瘤。在一些实施例中,疾病或病症是胃癌(诸如产生甲胎蛋白的胃癌)。在一些实施例中,疾病或病症是结肠直肠癌。在一些实施例中,疾病或病症是食道癌。在一些实施例中,疾病或病症是甲状腺癌。

[0422] 在一些实施例中,这些方法包括过继性细胞疗法,由此将表达所提供的GPC3靶向的CAR的基因工程化细胞施用于受试者。这样的施用可以按GPC3靶向的方式促进细胞的激活(例如,T细胞激活),使得疾病或病症的细胞被靶向破坏。

[0423] 在一些实施例中,这些方法包括将这些细胞或含有这些细胞的组合物施用于受试者、组织或细胞,诸如患有疾病或病症、处于疾病或病症的风险中或怀疑患有疾病或病症的受试者、组织或细胞。在一些实施例中,将细胞、群和组合物施用于患有待治疗的特定疾病或病症的受试者,例如,通过过继性细胞疗法,诸如过继性T细胞疗法。在一些实施例中,将细胞或组合物施用于受试者,诸如患有疾病或病症或处于疾病或病症的风险中的受试者。在一些实施例中,这些方法由此治疗例如改善疾病或病症的一种或多种症状,诸如通过减轻表达GPC3的癌症中的肿瘤负荷。

[0424] 用于过继性细胞疗法的细胞施用方法是已知的,如例如以下文献中所述:美国专利申请公开号2003/0170238中所述;美国专利号4,690,915;Rosenberg,Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85(2011);Themeli等人,Nat Biotechnol.31(10):928-933(2013);Tsukahara等人,Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9(2013);以及Davila等人,PLoS ONE 8(4):e61338(2013)。这些方法可以与本文提供的方法和组合物结合使用。

[0425] 在一些实施例中,细胞疗法(例如过继性T细胞疗法)通过自体转移进行,其中细胞从待接受细胞疗法的受试者或源自这样的受试者的样品分离和/或以其他方式制备。因此,在一些方面,细胞源自需要治疗的受试者,并且在分离和处理后,将细胞施用于同一受试者。在其他实施例中,细胞疗法(例如过继性T细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中细胞从待接受或最终接受细胞疗法的受试者之外的受试者(例如第一受试者)分离和/或以其他方式制备。在此类实施例中,然后将细胞施用于相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施例中,第一受试者和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施例中,第一受试者和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施例中,第二受试者表达与第一受试者相同的HLA类型或超型。在其他实施例中,细胞疗法(例如过继性T细胞疗法)通过同种异体转移进行。

[0426] 在一些实施例中,施用细胞、细胞群或组合物的受试者是灵长类动物,诸如人。受试者可以是男性或女性,并且可以是任何合适的年龄,包括婴儿、少年、青少年、成人和老年

受试者。在一些实例中,受试者是用于疾病、过继性细胞疗法和/或用于评估毒性结果的经过验证的动物模型。

[0427] GPC3结合分子,诸如结合GPC3的抗体和嵌合抗原受体以及表达它们的细胞,可以通过任何合适的方式施用,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射、结膜下注射、眼球筋膜下注射、眼球后注射、球周注射或后近巩膜递送。在一些实施例中,它们通过肠胃外、肺内和鼻内施用,并且如果需要局部治疗,则通过病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

[0428] 有效预防和/或治疗疾病或病状的本文提供的预防剂或治疗剂的量可以通过标准临床技术确定。有效剂量可以从得自体外或动物模型测试系统的剂量-反应曲线外推。对于疾病的预防或治疗,结合分子或细胞的适当剂量可以取决于待治疗的疾病或病症的类型、结合分子的类型、疾病或病症的严重程度和病程、施用治疗剂是否用于预防或治疗目的、先前疗法、患者的临床病史和对药剂的反应,以及主治医师的判断。在一些实施例中,组合物、分子和细胞在一次或在一系列治疗中适当地施用于患者。

[0429] 例如,根据疾病的类型和严重程度,抗体的剂量可以包括约10 μ g/kg至100mg/kg或更多。可以间歇地施用多个剂量。可以施用初始较高的负荷剂量,随后施用一个或多个较低的剂量。在一些实施例中,其中药物组合物包含本文所述的抗体中的任一种,药物组合物以每天约10ng/kg至约100mg/kg个体体重或更多的剂量施用,例如,约1mg/kg/天至10mg/kg/天,这取决于施用途径。文献中提供了关于特定剂量和递送方法的指导(参见例如美国专利号4,657,760、5,206,344和5,225,212)。

[0430] 在含有结合分子的基因工程细胞的情况下,在一些实施例中,可以向受试者施用约一百万至约1千亿个细胞和/或每千克体重该量的细胞。在一些实施例中,其中该药物组合物包含本文所述的工程化免疫细胞中任一个,该药物组合物以至少约10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、或10⁹个细胞/kg个体体重中任一的剂量施用。剂量可以根据疾病或病症和/或患者和/或其他治疗的具体属性而变化。

[0431] 在一些实施例中,施用一次药物组合物。在一些实施例中,施用多次(例如2、3、4、5、6或更多次中的任一个)药物组合物。在一些实施例中,药物组合物在给药周期中施用一次或多次。给药周期可以是例如1、2、3、4、5或更多周,或1、2、3、4、5或更多个月。针对特定患者的最佳剂量和治疗方案可以由医学领域的技术人员通过监测患者的疾病体征并相应地调整治疗来确定。

[0432] 在一些实施例中,细胞或抗体作为组合治疗的一部分施用,诸如与另一种治疗干预(诸如另一种抗体或工程化细胞或受体或药剂,诸如细胞毒性剂或治疗剂)同时或以任何顺序依次施用。

[0433] 在一些实施例中,细胞或抗体与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗干预联合施用,同时或以任何顺序依次施用。在一些情况下,细胞与另一种疗法在足够接近的时间共同施用,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施例中,细胞或抗体在一种或多种另外的治疗剂之前施用。在一些实施例中,细胞或抗体在一种或多种另外的治疗剂之后施用。

[0434] 在某些实施例中,在将细胞施用于哺乳动物(例如人)后,通过多种已知方法中的

任一种测量工程化细胞群和/或抗体的生物活性。评估的参数包括体内(例如通过成像)或离体(例如通过ELISA或流式细胞术)工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合。在某些实施例中,工程化细胞破坏靶细胞的能力可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如在例如Kochenderfer等人, *J. Immunotherapy*, 32 (7) : 689-702 (2009) 以及 Herman等人 *J. Immunological Methods*, 285 (1) : 25-40 (2004) 中描述的细胞毒性测定法。在某些实施例中,细胞的生物活性还可以通过测定某些细胞因子诸如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF的表达和/或分泌来测量。在一些方面,生物活性通过评估临床结果诸如肿瘤负荷或负荷的减少来测量。

[0435] 在一些具体实施例中,本文提供了用于治疗受试者的疾病或病症的方法,该方法包括向受试者施用结合分子,该结合分子包含如上文第5.2部分中所述的结合GPC3的抗体,包括例如具有表3和表4中的CDR的那些,并且更具体地包含抗GPC3抗体,该抗GPC3抗体包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的LCDR3,或(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的LCDR3,或(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的LCDR3,或(iv)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的LCDR3,或(v)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的LCDR3,或(vi)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的LCDR3,或(vii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的LCDR3,或(viii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的LCDR3,或(ix)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HCDR3、包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的LCDR3,或(x)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCDR1、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HCDR2、包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的

HCDR3、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LCDR1、包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的LCDR2和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施例中,抗体包含选自SEQ ID NO:61-70和117-122的组的VH结构域和选自SEQ ID NO:71-80和123-125的组的VL结构域。在一些实施例中,疾病或病症是GPC3相关的疾病或病症。在一些实施例中,疾病或病症是GPC3阳性癌症,即表达或过表达GPC3的癌症。GPC3阳性癌症的实例包括但不限于HCC、黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌(诸如产生甲胎蛋白的胃癌)、结肠直肠癌、食道癌和甲状腺癌。

在一些实施例中,疾病或病症是HCC。在一些实施例中,疾病或病症是黑色素瘤。

在一些实施例中,疾病或病症是卵巢透明细胞癌。在一些实施例中,疾病或病症是卵黄囊瘤(YST)。在一些实施例中,疾病或病症是成神经细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是肝母细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)。在一些实施例中,疾病或病症是肺鳞状细胞癌。在一些实施例中,疾病或病症是肺腺癌。在一些实施例中,疾病或病症是大细胞肺癌。在一些实施例中,疾病或病症是小细胞肺癌。在一些实施例中,疾病或病症是睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是脂肪肉瘤。在一些实施例中,疾病或病症是宫颈上皮内瘤变。在一些实施例中,疾病或病症是肾上腺腺瘤。在一些实施例中,疾病或病症是神经鞘瘤。在一些实施例中,疾病或病症是胚胎性肿瘤。在一些实施例中,疾病或病症是胃癌(诸如产生甲胎蛋白的胃癌)。在一些实施例中,疾病或病症是结肠直肠癌。在一些实施例中,疾病或病症是食道癌。在一些实施例中,疾病或病症是甲状腺癌。

[0436] 在其他具体实施例中,本文提供了用于治疗受试者的疾病或病症的方法,该方法包括向受试者施用表达本文提供的CAR的工程化免疫效应细胞,例如包含如上文第5.2部分中所述的结合GPC3的抗体(诸如scFv)的CAR,包括例如具有表3和表4中的CDR的那些,以及包含选自由SEQ ID NO:61-70和117-122组成的组的VH结构域和选自由SEQ ID NO:71-80和123-125组成的组的VL结构域的那些。在更具体的实施例中,用于治疗疾病或病症的本发明免疫效应细胞的CAR中的抗体是包含与SEQ ID NO:81-90、128和129中任一个的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的scFv。在其他具体的实施例中,用于治疗疾病或病症的工程化免疫效应细胞(诸如T细胞)包含CAR,该CAR包含多肽,该多肽包含SEQ ID NO:91-100、107-116和130-131的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:91-100、107-116和130-131的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,疾病或病症是GPC3相关的疾病或病症。在一些实施例中,疾病或病症是GPC3阳性癌症,即表达或过表达GPC3的癌症。GPC3阳性癌症的实例包括但不限于HCC、黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤(YST)、成神经细胞瘤、肝母细胞瘤、肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤、脂肪肉瘤、宫颈上皮内瘤变、肾上腺腺瘤、神经鞘瘤、胚胎性肿瘤、胃癌(诸如产生甲胎蛋白的胃癌)、结肠直肠癌、食道癌和甲状腺癌。在一些实施例中,疾病或病症是HCC。在一些实施例中,疾病或病

症是黑色素瘤。在一些实施例中,疾病或病症是卵巢透明细胞癌。在一些实施例中,疾病或病症是卵黄囊瘤(YST)。在一些实施例中,疾病或病症是成神经细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是肝母细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是肾母细胞瘤(维尔姆斯瘤)。在一些实施例中,疾病或病症是肺鳞状细胞癌。在一些实施例中,疾病或病症是肺腺癌。在一些实施例中,疾病或病症是大细胞肺癌。在一些实施例中,疾病或病症是小细胞肺癌。在一些实施例中,疾病或病症是睾丸非精原细胞性生殖细胞瘤。在一些实施例中,疾病或病症是脂肪肉瘤。在一些实施例中,疾病或病症是宫颈上皮内瘤变。在一些实施例中,疾病或病症是肾上腺腺瘤。在一些实施例中,疾病或病症是神经鞘瘤。在一些实施例中,疾病或病症是胚胎性肿瘤。在一些实施例中,疾病或病症是胃癌(诸如产生甲胎蛋白的胃癌)。在一些实施例中,疾病或病症是结肠直肠癌。在一些实施例中,疾病或病症是食道癌。在一些实施例中,疾病或病症是甲状腺癌。

5.7.2. 诊断和检测方法及用途

[0437] 在另一方面,本文提供的方法涉及使用本文提供的结合分子,例如结合GPC3的抗体和含有此类抗体的分子(诸如缀合物和复合物),用于检测、预后、诊断、分期、确定特定治疗与一种或多种组织或细胞类型的结合,和/或告知受试者的治疗决定,诸如通过检测GPC3和/或其由抗体识别的表位的存在。

[0438] 在一些实施例中,提供了用于诊断或检测方法的抗GPC3抗体(诸如本文所述的抗GPC3抗体中的任一种)。在另一方面,提供了检测生物样品中GPC3的存在的方法。在某些实施例中,该方法包括检测生物样品中GPC3蛋白的存在。在某些实施例中,GPC3是人GPC3。在一些实施例中,这些方法是与表达GPC3的疾病或病症相关的诊断和/或预后方法。在一些实施例中,这些方法包括孵育和/或探测生物样品和/或将抗体施用于受试者。在某些实施例中,生物样品包括细胞或组织或其部分,诸如肿瘤或癌组织或其活检或切片。在某些实施例中,接触在允许抗GPC3抗体与样品中存在的GPC3结合的条件下进行。在一些实施例中,这些方法进一步包括检测样品中抗GPC3抗体与GPC3之间是否形成复合物,诸如检测这种结合的存在或不存在或水平。这种方法可以是体外或体内方法。在一个实施例中,抗GPC3抗体用于选择适合用抗GPC3抗体或工程化抗原受体治疗的受试者,例如,其中GPC3是用于选择患者的生物标志物。

[0439] 在一些实施例中,使样品(诸如细胞、组织样品、裂解物、组合物或源自其的其他样品)与抗GPC3抗体接触,并测定或检测抗体与样品(例如样品中的GPC3)之间的结合或复合物的形成。当与相同组织类型的参考细胞相比证明或检测到测试样品中的结合时,它可能表明存在相关疾病或病症,和/或含有抗体的治疗剂将特异性结合与样品来源的组织或细胞或其他生物材料相同或相同类型的组织或细胞。在一些实施例中,样品来自人体组织并且可以来自患病和/或正常组织,例如来自患有待治疗的疾病或病症的受试者和/或来自与此类受试者相同物种但未患有待治疗的疾病或病症的受试者。在一些情况下,正常组织或细胞来自患有待治疗的疾病或病症的受试者,但其本身不是患病的细胞或组织,诸如来自与给定受试者中存在的癌症相同或不同器官的正常组织。

[0440] 可以使用本领域已知的用于检测特异性抗体-抗原结合的各种方法。示例性免疫测定包括荧光偏振免疫测定(FPIA)、荧光免疫测定(FIA)、酶免疫测定(EIA)、浊度抑制免疫测定(NIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。可以使用指示剂部分或标记

基团以满足该方法的各种用途的需要,这些用途通常由测定设备的可用性和兼容的免疫测定程序决定。示例性标记包括放射性核素(例如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 或 ^{32}P 和/或铬(^{51}Cr)、钴(^{57}Co)、氟(^{18}F)、钆(^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、锗(^{68}Ge)、钬(^{166}Ho)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、碘(^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、镧(^{140}La)、镱(^{177}Lu)、锰(^{54}Mn)、钼(^{99}Mo)、钯(^{103}Pd)、磷(^{32}P)、镨(^{142}Pr)、钷(^{149}Pm)、铼(^{186}Re 、 ^{188}Re)、铑(^{105}Rh)、钌(^{97}Ru)、钐(^{153}Sm)、钪(^{47}Sc)、硒(^{75}Se)、(^{85}Sr)、硫(^{35}S)、锝(^{99}Tc)、钛(^{201}Ti)、锡(^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、氦(^3H)、氙(^{133}Xe)、镱(^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、钇(^{90}Y)、酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶或 β -半乳糖苷酶)、荧光部分或蛋白(例如,荧光素、罗丹明、藻红蛋白、GFP或BFP)或发光部分(例如,由Quantum Dot Corporation (Palo Alto, Calif.)提供的QdotTM纳米颗粒)。用于进行上述各种免疫测定的各种通用技术是已知的。

[0441] 在某些实施例中,提供了标记的抗体(诸如抗GPC3抗体)。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(诸如荧光、发色团、电子致密、化学发光和放射性标记),以及例如通过酶反应或分子相互作用间接检测的部分,诸如酶或配体。在其他实施例中,抗体没有被标记,并且可以使用与任何抗体结合的标记抗体来检测其存在。

5.8. 套件和制品

[0442] 还提供了包含本文所述的任何抗体、嵌合抗原受体或工程化免疫效应细胞的套件、单位剂量和制品。在一些实施例中,提供了含有本文所述的药物组合物中的任一种的套件,并且优选提供了其使用说明书。

[0443] 本申请的套件在合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、罐子、柔性包装(例如,密封的聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。套件可以任选地提供其他组成部分,诸如缓冲液和解释信息。因此本申请还提供了制品,其包括小瓶(如密封的小瓶)、瓶、罐子、柔性包装等。

[0444] 该制品可以包括容器和该容器上或与该容器相关的标签或包装插页。合适的容器包括例如,瓶、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)形成。通常,容器容纳有效治疗本文所述的疾病或病症(例如,癌症)的组合物,并且可具有无菌进出口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装插页指示组合物用于治疗个体的特定病状。标签或包装插页将进一步包括用于将组合物施用于个体的说明书。标签可指示用于重构和/或使用的指导。容纳药物组合物的容器可以是多次使用的小瓶,其允许重复施用(例如,2-6次施用)重构制品。包装插页是指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,这些说明书含有关于使用此类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。另外地,制品可进一步包含第二容器,该容器包含药学上可接受的缓冲液,例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。其可以进一步包括从商业和用户角度所需的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0445] 套件或制品可包括多个单位剂量的药物组合物和使用说明书,其包装的数量足以在药房(例如,医院药房和配药药房)中储存和使用。

[0446] 为简明起见,本文使用了某些缩写。一个实例是表示氨基酸残基的单字母缩写。氨基酸及其相应的三字母和单字母缩写如下:

氨基酸	三字母	单字母	氨基酸	三字母	单字母
-----	-----	-----	-----	-----	-----

丙氨酸	Ala	(A)	亮氨酸	Leu	(L)
精氨酸	Arg	(R)	赖氨酸	Lys	(K)
天冬酰胺	Asn	(N)	甲硫氨酸	Met	(M)
天冬氨酸	Asp	(D)	苯丙氨酸	Phe	(F)
半胱氨酸	Cys	(C)	脯氨酸	Pro	(P)
谷氨酸	Glu	(E)	丝氨酸	Ser	(S)
谷氨酰胺	Gln	(Q)	苏氨酸	Thr	(T)
甘氨酸	Gly	(G)	色氨酸	Trp	(W)
组氨酸	His	(H)	酪氨酸	Tyr	(Y)
异亮氨酸	Ile	(I)	缬氨酸	Val	(V)

[0447] 本披露在本文中总体上使用肯定性语言来描述多种实施例来披露。本披露还具体包括其中全部或部分排除特定主题的实施例,诸如物质或材料、方法步骤和条件、方案、程序、测定或分析。因此,即使本披露在本文中总体上未根据本披露不包括的内容来表达,但未明确包括在本披露中的方面仍然在本文中披露。

已经描述了本披露的多个实施例。然而,应当理解,在不脱离本披露的精神和范围的情况下可以进行各种修改。因此,以下实例旨在说明而非限制权利要求中描述的披露范围。

6. 实例

[0448] 下文是对研究中使用的各种方法和材料的描述,并且目的在于向本领域普通技术人员提供完整的披露内容和如何制造和使用本披露的描述,并且不旨在限制发明人认为是其披露内容的范围,也不旨在表示进行以下实验并且是可以进行的所有实验。应当理解,不必执行以现在时态写的示例性描述,而是可以执行这些描述以生成与本披露的传授内容相关联的数据等。已努力确保所用数字(例如,量、百分比等)的准确性,但应考虑一些实验误差和偏差。

6.1. 实例1—抗GPC3抗体的产生

动物免疫和免疫反应测试

[0449] 针对GPC3的抗体由杂交瘤平台通过金斯瑞的服务程序开发。人重组蛋白GPC3 (ACRO, 目录号GP3-H5223) 通过金斯瑞的ImmunoPlus™技术修饰。用含有200μL弗氏完全佐剂 (Sigma, 目录号F5881) 和50μg GPC3融合蛋白 (SEQ ID NO:106) 的1:1乳剂对雌性Ba1b/c和C57b1/6小鼠进行皮下免疫。然后,为了增强免疫力,每两周对小鼠腹膜内注射与皮下交替注射弗氏不完全佐剂 (Sigma, 目录号F5506) 和25μg GPC3融合蛋白的1:1乳剂。除No. 409和No. 416外,其他小鼠经五次免疫后血清效价均高于10⁵。

[0450] 抗体滴度最高的两只小鼠 (No. 410和No. 412) 接受了25μg GPC3融合蛋白(无佐剂)的腹膜内加强,并被选择用于杂交瘤融合。两只免疫小鼠的血清也显示出对典型GPC3⁺ HepG2细胞 (ATCC, 目录号HB-8065) 的显著结合活性。测试出血血清中的抗体显示与HepG2细胞结合,对于No. 410小鼠从19.1到112,并且对于No. 412小鼠从19.1到62.9。

抗GPC3抗体的筛选

[0451] 通过金斯瑞的服务将全长人、小鼠或食蟹猴GPC3编码cDNA (分别为NM_004484.3、NM_016697.3或XM_005594608.2) 合成为质粒PLVX-puro (Clontech, 目录号632164), 然后将

质粒分别命名为PLVX-huGPC3、PLVX-muGPC3或PLVX-cmGPC3。产生了高效价重组慢病毒并将其转导至SK-HEP-1细胞(ATCC, 目录号HTB-52)。将100 μ L慢病毒上清液(100倍浓缩)添加到6孔板中的50万个靶细胞中,并通过离心机(1200g, 32 $^{\circ}$ C, 90min)孵育混合物。在用嘌呤霉素筛选后,通过流式细胞术监测GPC3的体外细胞外表达。PE缀合的抗GPC3特异性单克隆抗体(R&D, 目录号FAB2119P)用作检测抗体。按照该方法,标记的SK-HEP-1-huGPC3的平均荧光强度(MFI)比SK-HEP-1细胞高7.67倍(MFI值分别为1350、176)。标记的SK-HEP-1-cmGPC3的MFI比SK-HEP-1细胞高4.36倍(MFI值分别为768、176)。同时,标记的SK-HEP-1-muGPC3的MFI也高于SK-HEP-1细胞。

[0452] 在最后一次加强免疫后三天,无菌制备具有良好滴度的小鼠脾细胞,并按照标准杂交瘤产生方案与sp2/0细胞融合。将人或食蟹猴GPC3转染的SK-HEP-1细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种于96孔U形底板(BD)中。将杂交瘤上清液转移到板中并与细胞在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时。然后将细胞用染色缓冲液(BSA/1 \times PBS)洗涤两次。添加PE-缀合的山羊抗小鼠IgG Fc抗体(Jackson, 目录号115115164),并在4 $^{\circ}$ C下在暗处孵育30分钟。然后将细胞洗涤两次并重悬于100 μ L染色缓冲液中。通过流式细胞术测量荧光强度并通过FlowJo分析。

[0453] 杂交瘤上清液用于初步筛选。初步结合筛选鉴定了30种可以产生抗原特异性结合抗体的杂交瘤。选择阳性结合剂进行亚克隆。将每种选择的细胞系的杂交瘤细胞以1个细胞/孔的密度接种在96孔板中。将板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的加湿培养箱中保持10-12天。通过FACS挑选并测试单个克隆。对选择的亚克隆进行纯化,并在结合测定、跨家族结合测定和分箱测定中进一步评估。

[0454] 通过快速ELISA SBA克隆分型系统-HRP套件(Southern Biotech, 目录号5300-05)鉴定单克隆抗体。通过TRIzol从杂交瘤细胞中提取总RNA,并通过使用抗体亚型的特异性和通用引物(Takara, 目录号6210A)逆转录成cDNA。通过RACE-PCR(Takara, 目录号28001488)扩增小鼠免疫球蛋白的重链和轻链V区片段并亚克隆到pMD18-T载体系统(Takara, 目录号D101A)。通过载体特异性引物对插入的片段进行测序。最后,获得了LAb19301、LAb19302、LAb19303、LAb19304、LAb19305、LAb19306、LAb19307、LAb19308、LAb19309和LAb19310的独特V区核苷酸/蛋白序列。使用克隆分型系统-HRP(SouthernBiotech)确定抗体同种型。选择的抗原特异性克隆的CDR序列如下表3和表4所示。

表3. 来自选定克隆的重链CDR区的氨基酸序列

克隆 ID	HCDR1	HCDR2	HCDR3
LAAb19301	SGFSWH (SEQ ID NO: 1)	FMQYSGNTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 11)	REEGAWFAY (SEQ ID NO: 21)
LAAb19302	TYGMS (SEQ ID NO: 2)	YISSGGATTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 12)	LSIMIRGWFAY (SEQ ID NO: 22)
LAAb19303	DYEMH (SEQ ID NO: 3)	AIDPETGATAYNQKFKG (SEQ ID NO: 13)	YYSFAY (SEQ ID NO: 23)
LAAb19304	AYEMH (SEQ ID NO: 4)	GIDPETGNTAYSQKFKG (SEQ ID NO: 14)	YYSFAY (SEQ ID NO: 24)
LAAb19305	AYEMH (SEQ ID NO: 5)	GIDPETGNTAYSQNFKG (SEQ ID NO: 15)	YYSFAY (SEQ ID NO: 25)
LAAb19306	TYDMS (SEQ ID NO: 6)	YISSGGATTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 16)	LSLMIRGWFAY (SEQ ID NO: 26)
LAAb19307	TYDMS (SEQ ID NO: 7)	YISSGGNSPYYPQTVKG (SEQ ID NO: 17)	QNIARRGAMDF (SEQ ID NO: 27)
LAAb19308	TYGMS (SEQ ID NO: 8)	YISSGGANTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 18)	LSTLVRGWFAY (SEQ ID NO: 28)
LAAb19309	DYEMH (SEQ ID NO: 9)	GIDPETGNTAYSQKFKG (SEQ ID NO: 19)	YYSFAY (SEQ ID NO: 29)
LAAb19310	VSPMT (SEQ ID NO: 10)	LIHPYNGDTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 20)	WGNYYPYAMDY (SEQ ID NO: 30)

表4. 来自选定克隆的轻链CDR区的氨基酸序列

克隆 ID	LCDR1	LCDR2	LCDR3
LAAb19301	GSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 31)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 41)	SQSTHFPFT (SEQ ID NO: 51)
LAAb19302	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 32)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 42)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 52)
LAAb19303	RSSQSFVHSNGNTYLQ (SEQ ID NO: 33)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 43)	FQGSHPYPT (SEQ ID NO: 53)
LAAb19304	RSSQTIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 34)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 44)	FQVSHVPYT (SEQ ID NO: 54)
LAAb19305	RSSQTIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 35)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 45)	FQVSHVPYT (SEQ ID NO: 55)
LAAb19306	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 36)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 46)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 56)
LAAb19307	TSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 37)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 47)	SQSTHVPPT (SEQ ID NO: 57)
LAAb19308	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 38)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 48)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 58)
LAAb19309	RSSQTIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 39)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 49)	FQVSHVPYT (SEQ ID NO: 59)
LAAb19310	KASQNVNSTVA (SEQ ID NO: 40)	LTSNRHT (SEQ ID NO: 50)	LQHWNPYPT (SEQ ID NO: 60)

抗GPC3抗体的纯化

[0455] 在将pH调节至7.0后,将收获的杂交瘤上清液上样至蛋白A柱(GE Healthcare,目录号17040201)。将抗体用甘氨酸洗脱,然后立即用1M Tris中和。通过Nano Drop测试抗体浓度。通过SDS-PAGE(GenScript目录号M42012)评估蛋白的纯度。通过A280方法测定浓度。蛋白表达的代表性数据总结于表5中。

表5. 抗体表达信息

样品代码	纯度	浓度 (mg/mL)
LAAb19301	~92%	0.607
LAAb19302	~97%	1.407
LAAb19303	~92%	1.299
LAAb19304	~95%	1.407
LAAb19305	~98%	1.458
LAAb19306	~91%	1.779
LAAb19307	~93%	0.607
LAAb19308	~93%	1.710
LAAb19309	~93%	1.279
LAAb19310	~93%	0.607

抗GPC3抗体的亲和力

[0456] 通过表面等离子体共振 (SPR) (例如, Biacore) 测量抗体与重组人GPC3的结合动力学。使用简单的一对一Langmuir结合模型 (Biacore评估软件) 计算结合速率 (K_a) 和解离速率 (K_d)。平衡解离常数 (K_D) 计算为比率 K_d/K_a 。所测得的抗人GPC3抗体的结合亲和力示于表6

中。

表6.GPC3抗体对蛋白的亲合力测量

配体	分析物	Chi ² (RU ²)	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	Rmax (RU)
LAB19301	hGPC3	0.0976	1.69E+04	2.07E-03	1.22E-07	31.63
LAB19302	hGPC3	0.28	2.58E+04	0.001835	7.12E-08	45.74
LAB19303	hGPC3	0.449	3.34E+04	4.60E-04	1.38E-08	41.41
LAB19304	hGPC3	0.35	2.70E+04	1.38E-04	5.11E-09	56.51
LAB19305	hGPC3	0.0782	3.11E+04	1.30E-04	4.19E-09	32.97
LAB19306	hGPC3	0.216	2.71E+04	7.70E-04	2.84E-08	16.7
LAB19307	hGPC3	0.347	3.02E+04	0.001776	5.87E-08	64.69
LAB19308	hGPC3	0.0532	2.47E+04	0.001022	4.14E-08	33.46
LAB19309	hGPC3	0.268	2.33E+04	1.95E-04	8.38E-09	60.01
LAB19310	hGPC3	1.4	3.69E+04	4.65E-04	1.26E-08	70.87

通过FACS结合GPC3细胞系

[0457] 将SK-HEP-1-huGPC3细胞和SK-HEP-1-cmGPC3以 1×10^5 个细胞/孔的密度铺板在96孔U形底板(BD)中。将纯化的抗体在染色缓冲液中稀释并与细胞在4℃下孵育1小时。然后将细胞用染色缓冲液(BSA/1×PBS)洗涤两次。添加PE-缀合的山羊抗小鼠IgG Fc抗体,并在4℃下在暗处孵育30分钟。然后将细胞洗涤两次并重悬于100μL染色缓冲液中。通过流式细胞术测量荧光强度并通过FlowJo分析。

[0458] 如表7所示,所有抗体均可特异性结合SK-HEP-1-huGPC3,但不特异性结合空SK-HEP-1细胞。此外,一些GPC3抗体还可以与小鼠GPC3交叉反应,这将提供潜在的安全性评估方法。

表7.抗体对GPC3细胞系的结合能力

蛋白代码	阳性群体, %			
	结合 SK-HEP-1	结合 SK-HEP-1-huGPC3	结合 SK-HEP-1-muGPC3	结合 SK-HEP-1-cmGPC3
LAB19301	n.s.	72.6	17.5	18.5
LAB19302	n.s.	91.5	81.8	12.3
LAB19303	n.s.	92.6	0.72	83.1
LAB19304	n.s.	91.9	25.6	94.6
LAB19305	n.s.	92.6	17.0	94.2
LAB19306	n.s.	86.2	75.8	3.32
LAB19307	n.s.	92.9	83.3	11.6
LAB19308	n.s.	91.4	82.4	9.55
LAB19309	n.s.	92.7	1.02	91.9
LAB19310	n.s.	91.3	83.9	22.3
同种型	n.s.	0.85	0.91	0.43

6.2.实例2—基于单特异性scFv的嵌合抗原受体(CAR)的制备和体外筛选

[0459] 化学合成从N-末端到C-末端包含CD8α铰链结构域(SEQ ID NO:102)、CD8α跨膜结

构域 (SEQ ID NO:103)、CD137共刺激信号传导结构域 (SEQ ID NO:104) 和CD3 ζ 胞内信号传导结构域 (SEQ ID NO:105) 的编码CAR主链多肽的CAR主链序列,并将其克隆到下游预修饰的PT7载体中,并可操作地连接到组成型T7启动子。所得CAR主链载体命名为“PT7-T7-LB193”。载体中的多克隆位点 (MCS) 允许将包含可操作地连接到编码与抗GPC3 scFv片段的N-末端融合的CD8 α 信号肽 (SEQ ID NO:101) 的核酸序列的Kozak序列的核酸序列插入CAR主链载体中,在CAR主链序列上游并可操作地连接到CAR主链序列。化学合成编码CD8 α 信号肽和抗GPC3 scFv片段的核酸序列,并通过本领域已知的分子克隆技术经由MluI (5'-ACGCGT-3') (SEQ ID NO:140) 和SpeI (5'-ACTAGT-3') (SEQ ID NO:141) 限制性位点将其克隆到PT7-T7-LB193中。通过将体外转录RNA所需的元件克隆到pUC57载体 (金斯瑞,目录号SD1176) 来构建PT7-T7-LB193载体。

[0460] 通过组合LAb19301-LAb19310单克隆抗体 (SEQ ID NO:81-90) 的VH和VL以将单特异性CAR构建到PT7-T7-LB193载体骨架中,分别产生十个抗GPC3scFv,LAb19301-LAb19310 scFv。通过融合人CD8 α 前导序列、人CD8 α 跨膜结构域和人T细胞受体的CD137和CD3 ζ 链的胞内信号传导结构域进一步修饰每种抗GPC3 scFv,以产生嵌合抗原受体。将编码所选择的scFv克隆的核酸序列可操作地连接到编码CD8 α 信号肽的核酸序列的3'。化学合成融合核酸序列,并通过本领域已知的分子克隆技术经由MluI (5'-ACGCGT-3') (SEQ ID NO:140) 和SpeI (5'-ACTAGT-3') (SEQ ID NO:141) 限制性位点将其克隆到PT7-T7-LB193 CAR主链中。

[0461] 将GPC3 CAR DNA线性化,然后使用mMESSAGE mMACHINE T7RNA转录套件 (ThermoFisher#AM1344) 合成RNA。使用转录套件产生所有RNA。为了使体外转录的RNA聚腺苷酸化以提高翻译起始效率,使用poly (A) 加尾套件 (ThermoFisher#AM1350) 将所有mRNA在RNA的3'末端添加长度为至少150个核苷酸的poly (A) 尾。在加帽和poly (A) 加尾后,用RNeasy Mini Kit (QIAGEN#74104) 纯化RNA。

T细胞纯化

[0462] PBMC购自Hemacare (#17044560)。使用Pan T细胞分离套件 (Miltenyi#130-096-535),根据如下所述的制造商的方案从PBMC中纯化人T细胞。测定细胞数,并将细胞悬浮液以300g离心10分钟。然后完全吸出上清液,并每107个总细胞将细胞沉淀重悬于40 μ L缓冲液中。每107个总细胞添加10 μ L Pan T细胞生物素-抗体混合物,充分混合并在冰箱 (2-8 $^{\circ}$ C) 中孵育约5分钟。然后每107个细胞添加30 μ L缓冲液。每107个细胞添加20 μ L Pan T细胞微珠混合物。将细胞悬浮液混合物充分混合并在冰箱 (2-8 $^{\circ}$ C) 中再孵育10分钟。磁分离至少需要500 μ L。对于磁分离,将LS柱置于合适的MACS分离器的磁场中。通过用3mL缓冲液冲洗来制备柱。然后将细胞悬浮液施加到柱上,并收集含有未标记细胞的流出物,这代表富集的T细胞部分。通过用3mL缓冲液洗涤柱并收集通过的未标记细胞来收集另外的T细胞。这些未标记的细胞再次代表富集的T细胞,并与前一步骤的流出物组合。然后将收集的富集T细胞离心并重悬于RPMI-1640+300IU/mL IL-2中。

[0463] 制备的T细胞随后用人T细胞TransAct套件 (Miltenyi#130-111-160),根据制造商方案预激活48小时,其中抗CD3/CD28 MACSiBead颗粒以10 μ L/百万的珠与细胞比率添加。

[0464] 对于CAR-T细胞制备,将预激活的T细胞以 5×10^6 个细胞重悬于130 μ L电穿孔缓冲液 (Celetrix#13-0104) 中,并添加10 μ g mRNA用于电穿孔。未电穿孔的T淋巴细胞用作阴性对照,表达不同抗GPC3 scFv CAR的电穿孔T细胞的阳性率为67.4%-85.6% (图1)。

细胞毒性测定

[0465] 靶细胞是GPC3阳性人肝细胞癌(HCC)细胞系HepG2.Luc(ATCC#HB-8065)、Huh7.Luc(Cobioer#CBP60202)或GPC3阴性细胞系SK-HEP1.Luc(ATCC#HTB-52)、A549.Luc(ATCC#CRM-CCL-185)细胞系。用本领域已知的技术工程化所有细胞系以表达萤火虫荧光素酶。将GPC3 CAR-T细胞和靶细胞以不同比率(各 2×10^3 个细胞/孔)混合,在384孔板中培养24小时。为了测定CAR-T对肿瘤细胞的细胞毒性,根据制造商的方案制备One-glo发光荧光素酶测定试剂(Promega#E6110),并添加到共培养的细胞中以检测孔中剩余的荧光素酶活性。由于荧光素酶仅在肿瘤细胞中表达,因此孔中剩余的荧光素酶活性与孔中活靶细胞的数量直接相关。通过在不存在效应细胞的情况下向靶细胞中添加培养基来获得最大荧光素酶活性。通过在开始细胞毒性测定时添加最终浓度为1%的Triton X-100来测定最小荧光素酶活性。通过以下公式计算特异性细胞毒性:特异性细胞毒性% = $100\% \times (1 - (RLU_{\text{样品}} - RLU_{\text{min}}) / (RLU_{\text{max}} - RLU_{\text{min}}))$ 。

[0466] 如图2至图3所示,GPC3 CAR-T细胞以剂量依赖性方式对GPC3阳性-HCC细胞系HepG2.Luc和Huh7.Luc细胞表现出不同水平的细胞毒性。但是,与UnT相比,没有CAR-T细胞对GPC3阴性细胞系SK-HEP1.Luc和A549.Luc显示出有效的细胞毒性。在这些克隆中,根据细胞毒性数据,LIC19301 CAR-T细胞、LIC19303 CAR-T细胞和LIC19309 CAR-T细胞是最有效的。在E/T比率为5:1时,LIC19301 CAR-T细胞、LIC19303 CAR-T细胞和LIC19309 CAR-T细胞对HepG2.Luc和Huh7.Luc细胞均显示出近100%的细胞毒性。

IFN- γ 和TNF- α 释放

[0467] 除了针对GPC3阳性癌细胞的细胞毒活性之外,还分析了GPC3 CAR-T细胞产生IFN- γ 和TNF- α 的能力。将GPC3 CAR-T细胞和靶细胞(Huh7或SK-HEP1)以2的E/T比率(各 2×10^3 个靶细胞/孔)混合,在384孔板中培养24小时,并通过ELISA测量培养上清液中产生的IFN- γ 和TNF- α 的浓度。结果,源自上述10种scFv克隆的所有GPC3 CAR-T细胞均显示出依赖于GPC3表达产生IFN- γ 和TNF- α 的能力。IFN- γ 和TNF- α 的释放均为CAR和GPC3抗原特异性的,但在不同CAR-T细胞中有所不同,并且与细胞毒性效力没有显著相关性。如图4所示,CAR-T细胞分泌的IFN- γ 和TNF- α 的浓度在基于GPC3的激活后显著增加,在5809.7-24997.2pg/mL(IFN- γ)和1638.1-5667.9pg/mL(TNF- α)的范围内。在与GPC3阳性Huh7细胞共培养后,在测试的所有CAR-T细胞中,LIC19303 CAR-T细胞、LIC19304 CAR-T细胞、LIC19305 CAR-T细胞和LIC19309 CAR-T细胞表现出最高的细胞因子释放水平,而与GPC3阴性SK-HEP1细胞共培养的所有抗GPC3 CAR-T细胞均没有显示出特异性激活和细胞因子分泌。

6.3. 实例3—GPC3 CAR-T细胞在体内过继转移后的抗肿瘤作用

[0468] 在NCG小鼠异种移植模型中评估了LIC19309 CAR-T细胞的体内抗肿瘤功效。该模型通过依次对NOD/Nju小鼠中的Prkdc和I12rg基因座进行CRISPR/Cas9编辑产生与NOD/Nju同基因的小鼠来创建。NOD/Nju在Sirpa(SIRP α)基因中携带允许移植外源造血干细胞的突变(Schuler等人,Cell,1986,46(7):963-972; Sugamura等人,Annual review of immunology,1996,14(1):179-205; Yamauchi等人,The Journal of the American Society of Hematology,2013,121(8):1316-1325)。

[0469] Prkdc敲除产生缺乏适当T细胞和B细胞形成的SCID样表型。I12rg基因的敲除进一步加剧了SCID样表型,同时还导致NK细胞产生减少。这种“三重免疫缺陷”小鼠品系比常用

的免疫缺陷小鼠品系(包括SCID和裸鼠)免疫受损更多。Prkdc和I12rg是影响T细胞、B细胞、NK细胞和较小程度的树突细胞的成熟和形成的SCID(严重联合免疫缺陷)基因家族的一部分。破坏编码DNA依赖性蛋白激酶的催化亚基的Prkdc基因降低了在成熟的T细胞和B细胞的抗体多样性繁殖中所需的V(D)J重组所需的功能。破坏I12rg(编码在IL-2和多种IL受体(IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21)中发现的共同 γ 亚基)可防止未成熟淋巴细胞(T细胞、B细胞和NK细胞)和其他白细胞达到成熟,因为受体需要结合并诱导细胞因子介导的信号传导。NCG小鼠品系类似于能够承载异种移植细胞、组织和人免疫系统组分的其他三重免疫缺陷模型,因此能够研究肿瘤生物学和免疫-肿瘤学、感染性疾病、移植物抗宿主疾病(GvHD)、造血和组织移植研究。

[0470] 该菌株于2016年进一步转移到Charles River,现在可供北美客户使用,命名为NOD-Prkdc^{em26Cd52}I12rg^{em26Cd22}/NjuCr1,并且菌株代码:572。NCG模型的性能数据描述于例如以下文献中:Shultz等人,The Journal of Immunology,1995,154(1):180-191;Covassin等人,Clinical&Experimental Immunology,2011,166(2):269-280;以及Ma和Huang,The FEBS journal,2014,281(23):5186-5193。

[0471] 对于皮下异种移植模型,40只6-7周龄的NCG小鼠在右前腿皮下接种Huh7细胞(1×10^7 个细胞/小鼠)。当平均肿瘤体积接近 100mm^3 时(异种移植接种后第6天),将小鼠随机分成3组,并通过尾静脉注射分别用LIC19309 CAR-T细胞(2M/小鼠)、未电穿孔的T细胞(2M/小鼠)和仅溶剂进行处理。每周两次用数字卡尺测量肿瘤大小。根据下式计算肿瘤体积:

肿瘤体积 = $\frac{(\text{长度}) \times (\text{宽度})^2}{2}$ 。在过继转移后第7、14和21天,通过FACS检测小鼠血液中的CD3阳性T细胞。

[0472] 如图5(部分a)所示,与UnT组相比,在第16天观察到,接受过继转移LIC19309 CAR-T细胞的小鼠的肿瘤大小减小了78.9% (100.0mm^3 与 474.8mm^3),这表明LIC19309 CAR-T细胞在肿瘤消退中是有效的。如图5(部分b)所示,通过数字PCR检测小鼠外周血细胞中的CAR基因拷贝数,并且LIC19309 CAR-T从第7天开始表现出靶依赖性显著扩增并持续至少2周。第14天的LIC19309 CAR-T细胞的拷贝数是第0天的281.4倍 (107.888 与 0.3833)。在该实验期间,在所有三组中均未观察到小鼠体重减轻(图5,部分c)。

6.4. 实例4—抗GPC3人源化抗体的产生

小鼠抗体的人源化设计

[0473] 选择抗体LAb19309和LAb19305进行抗体人源化。针对人IgG种系数据库搜索抗GPC3 mAb的可变结构域序列。选择与每种抗体高度同源的三种人框架序列作为轻链和重链的人接受者。通过将鼠抗体的CDR移植到人种系的FR来制备人源化VH链或VL链。在一些情况下,回复突变可以与鼠种系匹配,但在其他情况下则不能匹配(如体细胞突变的情况)。三种重链的人源化LAb19309和LAb19305可变结构域分别表示为9VH1、9VH2、9VH3和5VH1、5VH2、5VH3,而三种轻链的人源化可变结构域分别表示为VL1、VL2、VL3。人源化VH和VL以及相应的人种系的序列信息如表8所示。

表8. 人源化抗体可变结构域

人源化可变链代码	人源化可变链SEQ ID NO.
9VH1	SEQ ID NO:117

9VH2	SEQ ID NO:118
9VH3	SEQ ID NO:119
5VH1	SEQ ID NO:120
5VH2	SEQ ID NO:121
5VH3	SEQ ID NO:122
VL1	SEQ ID NO:123
VL2	SEQ ID NO:124
VL3	SEQ ID NO:125

人源化抗体的产生和亲和力

[0474] 如上所述设计人源化可变重链和人源化可变轻链。通过将人源化VL结构域与人 κ 恒定区(hIgKCL, SEQ ID NO:126)融合构建嵌合轻链(LC),并且通过将人源化VH结构域与人IgG1恒定区(hIgG1CH, SEQ ID NO:127)融合构建嵌合重链(HC)。将设计的重链和轻链质粒插入pTT5载体以构建全长人IgG的表达质粒,其通过金斯瑞服务外包。包括前导序列的人源化重链(即,9VH1-hIgG1CH、9VH2-hIgG1CH、9VH3-hIgG1CH、5VH1-hIgG1CH、5VH2-hIgG1CH、5VH3-hIgG1CH)表达序列显示在SEQ ID NO:144-149中。包括前导序列的人源化轻链(即VL1-hIgKCL、VL2-hIgKCL、VL3-hIgKCL)表达序列显示在SEQ ID NO:150-152中。

[0475] 通过HC和LC质粒共转导产生具有全长重链和轻链的完整抗GPC3人源化抗体。还产生了包含通过将小鼠VH与hIgG1CH融合的嵌合重链和通过将小鼠VL与hIgKCL融合的嵌合轻链的嵌合LAb19309-hIgG1和LAb19305-hIgG1作为阳性对照。

[0476] 人源化抗体在10mL HEK293-6E细胞培养物中表达。将细胞离心并保留上清液。使用Biacore分泌到培养基中的粗抗体进行亲和力分级。为了进行亲和力分级,通过Fc捕获方法将抗体固定在传感器芯片上。GPC3用作分析物。然后选择几种结合剂以在HEK293或CHO-S细胞培养物中表达。使用树脂A亲和层析纯化分泌到培养基中的重组IgG。纯化的IgG在非还原条件下在SDS-PAGE中迁移为~150kDa条带,在还原条件下迁移为~50kDa条带和~25kDa条带。从SDS-PAGE判断,人源化IgG的纯度均超过90%。

[0477] 使用Biacore T200单独确认结合GPC3的纯化抗体的亲和力。通过Fc捕获方法将抗体固定在传感器芯片上。GPC3用作分析物。表面在注射另一种抗体之前再生。重复该过程直到分析了所有抗体。使用Biacore T200评估软件将实验数据局部拟合到1:1相互作用模型,获得抗体的解离速率。解离(kd)和缔合(ka)速率常数(KD)的数据由kd与ka的比率计算得出。GPC3对抗体的亲和力总结于表9和表10中。

表9.GPC3对纯化的人源化LAb19309抗体的亲和力

名称	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
嵌合 LAb19309 -hIgG1	GPC3	6.71E+04	2.39E-04	3.56E-09	62.95	0.0911
9VH1VL3- hIgG1	GPC3	9.13E+04	1.40E-04	1.53E-09	78.8	0.299
9VH3VL2- hIgG1	GPC3	1.34E+05	9.01E-05	6.72E-10	71.14	0.237
9VH3VL3- hIgG1	GPC3	1.29E+05	1.45E-04	1.13E-09	72.9	0.389

表10.GPC3对纯化的人源化LAb19305抗体的亲和力

配体	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
5VH2VL3-hIgG1	GPC3	1.61E+05	8.76E-05	5.44E-10	61.3	0.0401
5VH2VL2-hIgG1	GPC3	1.56E+05	8.91E-05	5.72E-10	78.55	0.0665
嵌合 LAb19305 - hIgG1	GPC3	1.23E+05	1.03E-04	8.40E-10	107.4	0.0675
5VH1VL2-hIgG1	GPC3	1.07E+05	1.17E-04	1.10E-09	80.25	0.0252

6.5. 实例5—基于人源化单特异性scFv的CAR的制备和体外筛选

[0478] 基于人源化抗体的亲和力分级,选择9VH1VL3-hIgG1 mAb和9VH3VL2-hIgG1 mAb的VH链和VL链构建嵌合抗原受体,分别命名为huLIC19309a和huLIC19309b。

[0479] 对于huLIC19309a CAR,LAb9VH1VL3 scFv (SEQ ID NO:128) 通过经由连接肽 (SEQ ID NO:132) 融合9VL3和9VH1区来构建。所得CAR (huLIC19309aCAR) 包含SEQ ID NO:130。类似地,对于huLIC19309b CAR,通过将9VL2和9VH3序列与接头 (SEQ ID NO:132) 融合来构建LAb9VH3VL2 scFv (SEQ ID NO:129)。所得CAR (huLIC19309b CAR) 包含SEQ ID NO:131。

[0480] 化学合成从N-末端到C-末端包含CD8 α 铰链结构域 (SEQ ID NO:102)、CD8 α 跨膜结构域 (SEQ ID NO:103)、CD137共刺激信号传导结构域 (SEQ ID NO:104) 和CD3 ζ 胞内信号传导结构域 (SEQ ID NO:105) 的编码CAR主链多肽的CAR主链序列,并将其克隆到下游预修饰的慢病毒载体 (pLSINK-BBzBB) 中,并可操作地连接到组成型hEF1 α 启动子用于体外转录。载体中的多克隆位点 (MCS) 允许将包含可操作地连接到编码与抗GPC3人源化scFv片段的N-末端融合的CD8 α 信号肽 (SEQ ID NO:101) 的核酸序列的Kozak序列的核酸序列插入CAR主链载体中,在CAR主链序列上游并可操作地连接到CAR主链序列。化学合成编码CD8 α 信号肽和抗GPC3人源化scFv片段的核酸序列,并通过本领域已知的分子克隆技术经由EcoRI (5'-GAATTC-3') (SEQ ID NO:142) 和SpeI (5'-ACTAGT-3') (SEQ ID NO:141) 限制性位点将其克隆到pLSINK-BBzBB CAR主链中。

[0481] 将含有pMDLg.pRRE (Addgene#12251)、pRSV-REV (Addgene#12253) 和pMD2.G (Addgene#12259) 的慢病毒包装质粒混合物与表达CAR构建体的载体以预优化的比率与聚醚酰亚胺 (PEI) 预混合,然后在25°C下孵育5分钟。然后将HEK293细胞添加到转染混合物中。之后,将细胞在37°C下在具有5%CO₂的细胞培养箱中孵育过夜。在4°C和3000g下离心15分钟后收集上清液,并通过0.45 μ m PES过滤器过滤,然后超速离心以进行慢病毒浓缩。然后小心弃去上清液,用预冷的DPBS小心冲洗病毒颗粒。将病毒适当液化,并储存在-80°C。通过转导CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞系的滴定法测定病毒滴度。

CAR-T细胞制备

[0482] PBMC购自Allcells (#LP190116)。使用实例2中的方法从PBMC中纯化人T细胞并将其预激活。

[0483] 对于CAR-T细胞制备,将预激活的T细胞以 1×10^6 个细胞/mL重悬于1mL完全培养基 (Tex MACS GMP培养基+300IU/mL IL-2) 中,并添加不同的慢病毒 (MOI=10) 用于转染。未转染的T淋巴细胞 (UnT) 用作阴性对照。LIC19309、huLIC19309a和huLIC19309b CAR-T的阳性

率分别为62.4%、53.6%和34.3% (图6)。

细胞毒性测定

[0484] 靶细胞是GPC3阳性人肝细胞癌 (HCC) 细胞系HepG2 (ATCC#HB-8065)、Huh7 (Cobioer#CBP60202)、PLC/PRF/5 (ATCC#CRL-8024) 或GPC3阴性细胞系K562 (ATCC#CCL-243)、Kato III (ATCC#HTB-103)、A549 (ATCC#CRM-CCL-185)、NUGC4 (JCRB#01262018)。用本领域已知的技术工程化所有细胞系以表达萤火虫荧光素酶。将GPC3 CAR-T细胞和靶细胞以不同比率 (各 2×10^3 个细胞/孔) 混合, 在384孔板中培养24小时。为了测定CAR-T对肿瘤细胞的细胞毒性, 根据制造商的方案制备One-glo发光荧光素酶测定试剂 (Promega#E6110)。

[0485] 如图7和图8所示, 人源化GPC3 CAR-T细胞以剂量依赖性方式对GPC3阳性-HCC细胞系HepG2.Luc、Huh7.Luc和PLC/PRF/5.Luc细胞表现出不同水平的细胞毒性。在E/T比率为3:1时, LIC19309 CAR-T细胞对HepG2细胞、Huh7细胞和PLC/PRF/5细胞的有效杀伤效率分别为98.30%、94.06%和82.33%。在相同条件下, huLIC19309a CAR-T细胞和huLIC19309b CAR-T细胞对这三种细胞系显示出93.75%、97.47%、73.51%和97.00%、94.06%、72.21%的比较细胞毒性效力, 表明抗体人源化不会损害CAR-T细胞的效力。与UnT相比, 没有一个CAR-T细胞对GPC3阴性细胞系显示出显著的细胞毒性 (图8)。

IFN- γ 和TNF- α 释放

[0486] 除了针对GPC3阳性癌细胞的细胞毒活性之外, 还分析了人源化GPC3CAR-T细胞产生IFN- γ 和TNF- α 的能力。仅GPC3 CAR-T细胞或GPC3 CAR-T细胞与靶细胞 (HepG2、Huh7或PLC/PRF/5) 以不同的E/T比率 (各 2×10^3 个靶细胞/孔, E/T=3:1、1:1、1:3) 混合, 在384孔板中培养20小时, 并通过HTRF测量两种培养上清液中产生的IFN- γ 和TNF- α 的浓度。IFN- γ 和TNF- α 的释放均为CAR和GPC3抗原特异性的, 但在不同CAR-T细胞中有所不同, 并且与细胞毒性效力没有显著相关性。如图9和图10所示, IFN- γ 和TNF- α 的释放水平随着抗原特异性CAR-T激活而显著增加。在huLIC19039a CAR-T细胞与GPC3阳性HepG2细胞以3:1的E/T共培养20小时后, IFN- γ 释放水平从1015.99pg/mL增加到31037.50pg/mL, TNF- α 从21.51pg/mL增加到5447.91pg/mL。在相同条件下, huLIC19309b CAR-T细胞和LIC19309 CAR-T细胞与HepG2共培养20小时后的IFN- γ 释放水平分别为24848.92pg/mL和29339.66pg/mL, 而TNF- α 释放水平分别为6080.85pg/mL和5256.41pg/mL (图9和图10)。综合来看, 人源化huLIC19309a CAR-T细胞和huLIC19309b CAR-T细胞表现出与非人源化LIC19309 CAR-T细胞相当的细胞因子释放水平。

6.6. 实例6—人源化GPC3 CAR-T细胞在体内过继转移后的抗肿瘤作用

[0487] 选择LIC19309 CAR-T细胞和huLIC19309b CAR-T细胞进行体内功效研究。对于皮下异种移植模型, 28只6-7周龄的NCG小鼠在右前腿皮下接种Huh7细胞 (1×10^7 个细胞/小鼠)。当平均肿瘤体积接近 100mm^3 时 (异种移植接种后第6天), 将小鼠随机分成7组, 并通过尾静脉注射分别用huLIC19309b CAR-T细胞 (0.33、1、3M/小鼠)、LIC19309 CAR-T细胞 (0.33、1、3M/小鼠) 和仅溶剂 (媒介物) 进行处理。每周两次用数字卡尺测量肿瘤大小。根据下式计算肿瘤体积:

$$\text{肿瘤体积} = \frac{(\text{长度}) \times (\text{宽度})^2}{2}。$$

[0488] 如图11(部分a)所示,与平均体积为1747.02mm³的对照组(媒介物)相比,观察到用3M huLIC19309b CAR-T细胞处理的G7组小鼠在第17天肿瘤大小减小97.4%,平均体积为45.41mm³,并且两只小鼠处于无肿瘤状态,这显示出huLIC19309b CAR-T细胞的有效抗肿瘤功效。在G4中用3M LIC19309 CAR-T细胞处理的小鼠显示出67.7%的肿瘤减小,体积为564.75mm³。基于肿瘤体积数据,人源化huLIC19309b CAR-T细胞在0.33M、1M和3M的所有三种剂量下均显示出优于LIC19309 CAR-T细胞的显著体内功效优势。

[0489] 为了分析CAR-T扩增效力,还在过继转移后第7、14、21和28天通过ddPCR(液滴数字PCR)检测小鼠血液中的CAR拷贝数。如图11(部分b)所示,huLIC19309b CAR-T从第7天到第14天表现出靶依赖性显著扩增,并且达到119.09个拷贝/ng的最高拷贝数。在达到峰值后,保持约50个拷贝/ng达2周。

[0490] 小鼠体重与肿瘤负荷呈负相关。随着肿瘤负荷增加和总体行为状态恶化,对照组(媒介物)小鼠的体重同时下降。在第17天,在0.33M、1M和3M的剂量下,对照组的平均体重为19.50g,而LIC19309 CAR-T细胞处理的小鼠的平均体重为19.95g、22.61g和23.34g。与媒介物或LIC19309 CAR-T细胞处理的小鼠相比,huLIC19309b CAR-T细胞处理的小鼠在第17天在0.33M、1M和3M的剂量下显示出21.41g、23.21g和25.57g的更高体重,表明huLIC19309b CAR-T细胞的更有效功效和更健康的小鼠状态(图11,部分c)。

6.7. 实例7—过表达人IL12p40和人CCL-19的CAR-T细胞的制备

6.7.1. 嵌合抗原受体的构建

[0491] 为了构建人源化抗GPC3 scFv CAR(H93 CAR),化学合成从N-末端到C-末端包含CD8 α 铰链结构域(SEQ ID NO:102)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:103)、CD137共刺激信号传导结构域(SEQ ID NO:104)和CD3 ζ 胞内信号传导结构域(SEQ ID NO:105)的编码CAR主链多肽的CAR主链序列,并将其克隆到下游预修饰的慢病毒载体(pLSINK-BBzBB)中,并可操作地连接到组成型hEF1 α 启动子用于体外转录。载体中的多克隆位点(MCS)允许将包含可操作地连接到编码与抗GPC3人源化scFv片段(即,包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的上述LAb9VH3VL2 scFv)的N-末端融合的CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:101)的核酸序列的Kozak序列的核酸序列插入CAR主链载体中,在CAR主链序列上游并可操作地连接到CAR主链序列。化学合成编码CD8 α 信号肽和抗GPC3人源化scFv片段的核酸序列,并通过本领域已知的分子克隆技术经由EcoRI(5'-GAATTC-3')和SpeI(5'-ACTAGT-3')限制性位点将其克隆到pLSINK-BBzBB CAR主链中。所得H93 CAR的氨基酸序列是SEQ ID NO:131。H93 CAR是上文描述的huLIC19309b CAR的另一个名称。CAR编码区显示在图12的顶部。

[0492] 基于H93 CAR主链,H93M CAR载体中的MCS允许插入包含编码人IL12p40(SEQ ID NO:135)和人CCL-19(SEQ ID NO:136)的核酸序列的核酸序列,该核酸序列通过与另一个2A自切割肽(例如,SEQ ID NO:138中所示的P2A片段)的C-末端融合的2A自切割肽(例如,SEQ ID NO:139中所示的T2A肽)连接,上游并可操作地连接到CD3 ζ 胞内信号传导结构域的C-末端。化学合成编码P2A肽和IL12p40-T2A-CCL-19肽的核酸序列,并通过HpaI(5'-GTAAAC-3')(SEQ ID NO:143)和MluI(5'-ACGCGT-3')(SEQ ID NO:140)限制性位点将其克隆到pLSINK-BBzBB CAR主链中。所得H93M CAR的氨基酸序列是SEQ ID NO:133,编码H93M CAR的核酸序列显示在SEQ ID NO:137中。H93M的CAR编码区呈现在图12的中间部分。不受任何理论束缚,H93M CAR-T细胞中过表达的IL12p40可以与内源性IL-23 α p19亚基形成IL-23,据报道该内

源性IL-23 α p19亚基在TCR刺激后被T细胞上调。参见例如Ma等人, Interleukin-23 engineering improves CAR T cell function in solid tumors. Nat Biotechnol. 2020 Apr; 38 (4) : 448-459。

[0493] 将含有pMDLg.pRRE (Addgene#12251)、pRSV-REV (Addgene#12253) 和pMD2.G (Addgene#12259) 的慢病毒包装质粒混合物与表达CAR构建体的载体以预优化的比率与聚醚酰亚胺(PEI) 预混合, 然后在25℃下孵育5分钟。然后将HEK293细胞添加到转染混合物中。之后, 将细胞在37℃下在具有5%CO₂的细胞培养箱中孵育过夜。在4℃和3000g下离心15分钟后收集上清液, 并通过0.45 μ m PES过滤器过滤, 然后超速离心以进行慢病毒浓缩。小心弃去上清液, 用预冷的DPBS小心冲洗病毒颗粒。将病毒适当液化, 并储存在-80℃。通过转导CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞系的滴定法测定病毒滴度。

6.7.2. CAR-T细胞制备

[0494] PBMC购自TPCS (#A19Z284097)。使用Pan T细胞分离套件 (Miltenyi#130-096-535) 从PBMC纯化人T细胞, 并使用实例2中的方法预激活。

[0495] 对于CAR-T细胞制备, 将预激活的T细胞以 0.5×10^6 个细胞/孔的密度铺板在24孔板中。然后, 将纯化的病毒添加到孔中。过夜后, 在收集、离心并用新鲜的RPMI-1640+300IU/mL IL-2重悬后, 将转导的细胞置于24孔G-Rex (Wilson Wolf#80192M) 中。未转导的T细胞(UnT) 用作阴性对照。在第7天, 裸H93 CAR-T细胞和H93M CAR-T细胞的CAR阳性率分别为39.3%和32.5% (图13)。

6.7.3. IL-23和CCL-19表达

[0496] 为了验证H93M CAR的结构, 在正常条件 (RPMI-1640+300IU/mL IL-2) 下培养CAR-T细胞, 并分析IL-23和CCL-19的分泌情况。简言之, 在6孔板中以 1×10^6 个细胞/mL培养细胞, 并分别在第12、14和17天收获上清液。根据制造商的方案, 使用人IL-23套件 (CISBIO#62HIL23PEG) 和CCL-19ELISA套件 (Abcam#ab100601) 测定IL-23和CCL-19的量。如图14所示, 与H93 CAR-T细胞和UnT相比, 仅H93M CAR-T细胞分泌IL-23 (286.9pg/ 10^6 个细胞-570.3pg/ 10^6 个细胞) 和CCL-19 (65.4pg/ 10^6 个细胞-237.2pg/ 10^6 个细胞) (既未检测到IL-23表达也未检测到CCL-19表达)。

6.8. 实例8—体外CAR-T细胞重复攻击测定

[0497] 为了评估CAR-T细胞在体外的持久性和耗竭性, 建立了CAR-T细胞重复攻击模型。通过GPC3阳性肿瘤细胞持续刺激CAR-T细胞数轮以获得CAR-T细胞的耗竭表型。在再攻击测定中有三组处理: H93 CAR-T组 (初始CAR-T细胞是H93CAR-T细胞)、H93M CAR-T组 (初始CAR-T细胞是H93M CAR-T细胞) 和UnT (初始T细胞是未用CAR转导的T细胞)。对于第一轮 (第1轮) 再攻击, CAR-T细胞与肿瘤细胞以1:1E/T比率在6孔板中共培养。过夜后, 轻轻收集孔中的CAR-T细胞, 离心, 并重悬于新鲜的CAR-T培养基 (RPMI-1640+300IU/mL IL-2) 中。然后将CAR-T细胞添加到新板中再培养2天。然后, 收集孔中的CAR-T细胞, 再次重悬于新鲜培养基中并添加到接种有新鲜肿瘤细胞的新板中 (第2轮)。通过在前一轮结束时CAR-T细胞的阳性比率计算添加的新鲜肿瘤细胞的数目。根据剩余CAR-T细胞的细胞数目和活力, 可以重复该过程几轮。在每轮肿瘤细胞再攻击后24小时分析CAR+T细胞中CD4+T细胞和CD8+T细胞的耗竭标志物PD-1和LAG3。在每轮结束时计数T细胞, 并在刺激后72小时对GPC3阳性HCC细胞系PLC/PRF/5进行细胞毒性测定。

6.8.1. T细胞的扩增

[0498] 为了确定H93M CAR-T细胞的扩增功能的益处,在每轮再攻击结束时记录总T细胞的细胞数和活力。

[0499] 如图15A所示,与H93 CAR-T组(第6轮10.5倍)和UnT组(第6轮0.2倍)相比,用PLC/PRF/5细胞重复刺激导致H93M CAR-T组细胞显著扩增(第6轮138.4倍)。同时,H93M CAR-T组的细胞活力仍然很高,作为比较,H93 CAR-T组和UnT组在每次刺激后逐渐降低(图15B)。

6.8.2. 细胞毒性测定和细胞因子释放

[0500] 还在CAR-T再攻击测定中在每两轮结束时评估了CAR-T细胞的细胞毒性,总T细胞:靶细胞比率为1:1。靶细胞是GPC3阳性PLC/PRF/5细胞,其通过本领域已知的技术工程化以表达萤火虫荧光素酶。每两轮结束收集细胞,混合靶细胞(2×10^3 个细胞/孔),在384孔板中培养24小时。为了测定CAR-T细胞对肿瘤细胞的细胞毒性,根据制造商的方案制备One-glo发光荧光素酶测定试剂(Promega#E6110),并添加到共培养的细胞中以检测孔中剩余的荧光素酶活性。由于荧光素酶仅在肿瘤细胞中表达,因此孔中剩余的荧光素酶活性与孔中活靶细胞的数量直接相关。通过在不存在效应细胞的情况下向靶细胞中添加培养基来获得最大荧光素酶活性。通过在开始细胞毒性测定时添加最终浓度为1%的Triton X-100来测定最小荧光素酶活性。通过以下公式计算特异性细胞毒性:特异性细胞毒性% = $100\% \times (1 - (\text{RLU样品} - \text{RLUmin}) / (\text{RLUmax} - \text{RLUmin}))$ 。

[0501] 如图16A所示,除了在第1轮之后显示出相同的细胞毒性(21.1%对22.4%),在第3轮之后,H93M CAR-T组显示出比H93 CAR-T组更高的细胞毒性。具体而言,H93M CAR-T组在第3轮后表现出74.4%的平均细胞毒性,在第5轮(80.7%)和第7轮(83.4%)后略有增加。而在H93 CAR-T组中观察到相对较低的细胞毒性,平均细胞毒性分别为52.7%(第3轮)、57.9%(第5轮)和47.0%(第7轮)。表明H93M CAR-T组对GPC3阳性HCC细胞系PLC/PRF/5.Luc细胞具有持续高水平的细胞毒性。

[0502] 为了进一步验证H93M CAR-T细胞与H93 CAR-T细胞相比在再攻击测定中针对GPC3阳性肿瘤细胞的持续细胞毒活性,在将CAR-T细胞与PLC/PRF/5.Luc细胞以1:1E/T比率(总T细胞:靶细胞)共培养24小时后,通过ELISA分析TNF- α 和IFN- γ 的产生。结果表明,与H93 CAR-T组相比,H93M CAR-T组产生TNF- α 和IFN- γ 的能力显著更高,并且在所有轮次中均显示出与细胞毒性效力的显著相关性。如图16B和图16C所示,H93M CAR-T组细胞分泌的TNF- α 和IFN- γ 浓度在第3轮至第5轮后显著升高,分别在451.2-1151.1pg/mL(TNF- α)和18353.7-37072.7pg/mL(IFN- γ)的范围内,而H93 CAR-T组细胞分泌的TNF- α 和IFN- γ 浓度在第3轮至第7轮后逐渐降低,分别在197.1-129.2pg/mL(TNF- α)和4993.1-1672.1pg/mL(IFN- γ)的范围内。

6.8.3. 阳性CAR-T细胞的比率变化

[0503] H93 CAR-T细胞和H93M CAR-T细胞的阳性比率在每两轮后计算,其随着刺激轮数的增加几乎相同,在30%-86%的范围内。最后,在第5轮后H93 CAR-T细胞和H93M CAR-T细胞的阳性比率没有增加(图17)。在第5轮再攻击后,H93M CAR-T细胞显示出高细胞毒性,与平坦CAR+% (图17)相比细胞毒性增加(图16A)。

6.8.4. T细胞的耗竭

[0504] 在再攻击测定中,每轮后24小时评估T细胞耗竭。分别使用抗人PD-1抗体

(Biolegend#329908) 和抗LAG-3抗体 (Invitrogen#17-2239-42) 标记作为两种耗竭标志物的PD-1和LAG-3, 并分析CD4+CAR+T细胞和CD8+CAR+T细胞双阳性亚群的表达水平。如图18A至图18D所示, 与H93 CAR-T组相比, H93M CAR-T组在所有轮次中均显示出耗竭标志物PD-1和LAG3的表达降低。特别是在第3轮至第5轮中, H93M CAR-T组中CD4+CAR+双阳性亚群的PD-1表达在13%和18%之间, 而H93 CAR-T组高于30% (图18A)。在所有轮次 (R2-R7) 中, 在CD4+CAR+双阳性亚群中H93M CAR-T组具有比H93 CAR-T组 (30%-49%) 显著更低的LAG-3表达 (12%-25%) (图18C)。在CD8+CAR+双阳性亚群中, PD-1在H93M CAR-T组中的表达水平仍低于H93 CAR-T细胞组 (第3轮至第7轮1.3%-4.1%对5.6%-9.4%) (图18B), 并且在第3轮至第5轮中, H93M CAR-T组的LAG3表达水平介于56.6%和82.9%之间, 低于H93 CAR-T组 (82.7%-88.1%) (图18D), 表明H93M CAR-T细胞具有抗耗竭能力。

6.9. 实例9—细胞迁移测定

[0505] 为了评估CCL-19的趋化功能, 进行了细胞迁移测定。通过迁移通过96孔transwell室 (Corning) 中5- μ m孔径的聚碳酸酯过滤器来测量应答T细胞的趋化性。用GPC3阳性人HCC细胞系PLC/PRF/5细胞刺激CAR-T细胞和UnT细胞, 30小时后收集共培养上清液。然后将125 μ L上清液置于下室中, 并将75 μ L未经处理的T细胞 (0.075M) 在上室中孵育。4、6和8小时后, 通过血液计数室对从上室迁移到下室的T细胞进行计数。在细胞迁移测定中有三组处理: H93 CAR-T组 (下室中的上清液取自与PLC/PRF/5细胞共培养的H93 CAR-T细胞)、H93M CAR-T组 (下室中的上清液取自与PLC/PRF/5细胞共培养的H93M CAR-T细胞) 和UnT组 (下室中的上清液取自与PLC/PRF/5细胞共培养的UnT细胞)。

[0506] 如图19A所示, 在不同时间点, 与PLC/PRF/5细胞共培养的H93M CAR-T细胞 (具有CCL-19的分泌) 的上清液比与PLC/PRF/5细胞共培养的H93 CAR-T细胞和与PLC/PRF/5细胞共培养的UnT细胞的上清液吸引更多的T细胞 (H93M CAR-T组与H93 CAR-T组: $p < 0.0001$)。具体而言, H93M CAR-T组可以在6小时 (0.104M) 内完全吸引上室的所有T细胞, 而无CCL-19产生的H93 CAR-T组和UnT组即使在8小时内也仅迁移较少的T细胞, 分别为0.032M和0.026M。此外, 通过CCL-19ELISA (Abcam#ab100601) 测量共培养上清液中CCL-19的浓度。该结果表明取自与PLC/PRF/5细胞共培养的H93M CAR-T细胞的上清液分泌了CCL-19 (4590.15 \pm 380.85pg/mL), 这进一步验证了H93M CAR-T细胞的趋化功能 (图19B)。

6.10. 实例10—在体内过继转移后CAR-T细胞的抗肿瘤作用

[0507] 在NCG小鼠异种移植模型中评估了CAR-T细胞的体内抗肿瘤功效。对于皮下异种移植模型, 6-7周龄的NCG小鼠在右前腿皮下接种Huh7细胞 (1.5×10^6 个细胞/小鼠)。当平均肿瘤体积接近100mm³时 (异种移植接种后第11天), 将小鼠随机分成6组, 并通过尾静脉注射分别用H93 CAR-T细胞 (0.2M或0.6M剂量)、H93M CAR-T细胞 (0.2M或0.6M剂量)、UnT (2.3M剂量, 与CAR-T组相同的总T细胞的细胞数) 和仅溶剂 (媒介物) 进行处理。每周两次用数字卡尺测量肿瘤大小。根据下式计算肿瘤体积: 肿瘤体积 = ((长度) \times (宽度)²) / 2。也分别在过继转移后第0、7、14、21和28天通过数字PCR检测小鼠血液中CAR-T细胞的拷贝数。

[0508] 由于动物伦理学, 在第20天将用媒介物、UnT和H93 CAR-T细胞处理的小鼠处死, 并且这三组的肿瘤体积达到2000mm³以上。继续记录用H93M CAR-T细胞处理的小鼠, 直到第27天 (剂量: 0.2M) 和第49天 (剂量: 0.6M)。如图20A所示, 与UnT和H93 CAR-T细胞组相比, 在第20天观察到施用过继转移H93M CAR-T细胞的小鼠的肿瘤大小分别减小了76.8%和74.6%

(584.3mm^3 对 2514.7mm^3 , 2297.3mm^3), 并且在第20天之后, 肿瘤大小仍然逐渐减小, 这表明H93M CAR-T细胞在较低剂量(0.2M/小鼠)下具有比H93 CAR-T细胞更好的治疗潜力。当剂量增加到0.6M/小鼠时, 如图20B所示, 施用H93M CAR-T细胞对肿瘤生长具有明显的抑制作用, 在第20天与UnT相比生长抑制率为96.0% (101.6mm^3 对 2514.7mm^3), 但在H93M CAR-T细胞处理组和H93 CAR-T细胞处理组中观察到类似的肿瘤消退(101.6mm^3 对 137.3mm^3)。在第34天, 用H93M CAR-T细胞处理的小鼠几乎没有肿瘤。

[0509] 通过数字PCR检测小鼠外周血细胞中的CAR基因拷贝数, 并且H93MCAR-T细胞在0.2M剂量下在第21天表现出显著的扩增, 随后减少, 而在整个处理过程中, 在用H93 CAR-T细胞和UnT处理的小鼠中没有明显的扩增(图20C)。在0.2M剂量下, H93M CAR-T细胞在第21天的拷贝数是第0天的335.6倍(133.4175个拷贝对0.3975个拷贝)。在0.6M剂量下, H93M CAR-T细胞和H93 CAR-T细胞在第7天后均显示出显著的扩增, 并且H93M CAR-T细胞具有比H93 CAR-T细胞更好的扩增能力(第21天272.2850个拷贝对83.6275个拷贝)(图20D)。

[0510] 在该实验期间, 无论0.2M剂量还是0.6M剂量, 在所有三组中均未观察到小鼠体重减轻(图21A和图21B)。但用H93 CAR-T细胞处理的小鼠在0.2M剂量下在第20天显示出诸如直毛、弓背和消瘦的症状, 而用H93M CAR-T细胞处理的小鼠则正常。在0.6M剂量下, 两组的小鼠外观均正常。

[0511] 为了验证H93M CAR-T细胞中IL-23的激活依赖性产生, 使用人IL-23套件(CISBIO#62HIL23PEG)和人IFN- γ 套件(CISBIO#62HIFNGPEG)分析了用CAR-T细胞处理后NCG小鼠外周血中IL-23和IFN- γ 的分泌水平。如图22A所示, 与H93 CAR-T细胞处理组相比, H93M CAR-T细胞处理组在低剂量(0.2M, 第21天)下显示出高达3倍的IL-23分泌水平。在高剂量(0.6M)的H93M CAR-T细胞处理的小鼠和H93 CAR-T细胞处理的小鼠中观察到类似的低水平的IL-23(图22B)。同时, 小鼠外周血中激活依赖性产生的IFN- γ 的分泌行为与IL-23相似(图22C和图22D), 表明H93M CAR-T细胞中IL-23的激活依赖性产生。

[0512] 为了研究H93M CAR-T细胞在体内的抗肿瘤作用, 使用免疫组织化学(IHC)研究T细胞的浸润情况和肿瘤部位巨噬细胞和树突状细胞(DC)的募集情况。简言之, 将组织石蜡切片载玻片在60°C下加热60分钟, 然后在二甲苯中脱蜡三次, 每次10分钟, 并在100%、100%、95%、90%、80%、70%酒精和水中再水合, 每次5分钟。通过将载玻片在抗原修复缓冲液中煮沸20分钟来进行抗原修复, 然后在将载玻片浸入抗原修复缓冲液中并冷却至室温(RT)后, 用3%过氧化氢的甲醇溶液处理载玻片10分钟以破坏内源性过氧化物酶活性。为了减少非特异性背景染色, 将载玻片与封闭缓冲液(用DPBS稀释的5%山羊血清)在2-8°C下孵育过夜。

[0513] 过夜后, 将载玻片在室温下孵育30分钟, 然后与稀释的一抗在37°C下孵育2小时, 并与二抗HRP缀合的抗小鼠IgG抗体(Fuzhou Maixin Biotech.Co., Ltd.#KIT-5002)在暗处室温孵育15分钟。根据制造商的说明书制备DAB底物, 并将200-500 μL DAB底物添加到载玻片中并在暗处孵育2分钟。通过用蒸馏水洗涤5分钟停止染色。最后向载玻片添加中性香脂, 并在苏木精复染、1%盐酸酒精分化、酒精脱水后封片。

[0514] 为了阐明H93M CAR-T细胞在较低剂量(0.2M)下增强抗肿瘤能力的机制, 使用TCR α (H-1)(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY#sc-515719)通过IHC在经处理小鼠的肿瘤组织中研究T细胞浸润。如图23所示, 与H93 CAR-T细胞和UnT处理组相比, H93M CAR-T细胞处理组中所有

三只小鼠的肿瘤部位的T细胞浸润均有所改善。在H93M CAR-T细胞处理组中,更多的T细胞浸润到中央肿瘤巢中,而在三只H93 CAR-T细胞处理的小鼠中,只有一只小鼠在肿瘤边缘区域有较少的T细胞浸润,其他小鼠在肿瘤部位的T细胞非常少。在UnT处理组中,三只小鼠的肿瘤部位没有观察到T细胞浸润。

[0515] 此外,还研究了肿瘤组织中的巨噬细胞和DC募集。使用抗CD68抗体 (Abcam# ab125212) 和抗CD11c抗体 (Cell signaling technology#97585S) 检测肿瘤组织中的小鼠巨噬细胞和DC。如图24所示,CD68+巨噬细胞 (左列) 和CD11c+DC (右列) 被DAB染色。巨噬细胞和DC向肿瘤部位的募集在H93M CAR-T细胞处理组中显著更高,而UnT和H93 CAR-T细胞处理组仅在肿瘤组织边缘有巨噬细胞募集。这些数据表明,与H93 CAR-T细胞和UnT相比,H93M CAR-T细胞可以在肿瘤组织中诱导更多的巨噬细胞和DC募集,并且更有效地在肿瘤组织中引发先天免疫应答。

[0516] 本文引用的所有专利、公开的申请和参考文献的传授内容均通过援引以其全文并入本文。虽然已经具体显示和描述了示例性实施例,但是本领域技术人员应当理解,在不脱离所附权利要求所涵盖的实施例的范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

[0517] 从上文可以理解,尽管为了说明的目的在本文中描述了特定实施例,但是可以在不脱离本文所提供的精神和范围的情况下进行各种修改。上文提及的所有参考文献通过援引以其全文并入本文。

序列表

<110> 南京传奇生物科技有限公司

<120> 靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)的抗体和嵌合抗原受体及其使用方法

<130> 14651-019-228

<140>

<141>

<150> PCT/CN2020/076937

<151> 2020-02-27

<160> 152

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR1

<400> 1

Ser Gly Phe Ser Trp His

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR1

<400> 2

Thr Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR1

<400> 3

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 4

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HCDR1
<400> 4
Ala Tyr Glu Met His
1 5
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HCDR1
<400> 5
Ala Tyr Glu Met His
1 5
<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HCDR1
<400> 6
Thr Tyr Asp Met Ser
1 5
<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HCDR1
<400> 7
Thr Tyr Asp Met Ser
1 5
<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR1

<400> 8

Thr Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR1

<400> 9

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR1

<400> 10

Val Ser Pro Met Thr

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 11

Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 12

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 13

Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Ala Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 14

Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 15

Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Asn Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 16

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 17

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser Pro Tyr Tyr Pro Gln Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 18

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 19

Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2

<400> 20

Leu Ile His Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3

<400> 21

Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe Ala Tyr

1

5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3

<400> 22

Leu Ser Ile Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3

<400> 23

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1

5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3

<400> 24

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3

<400> 25

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3

<400> 26

Leu Ser Leu Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3

<400> 27

Gln Asn Ile Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Phe

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3

<400> 28

Leu Ser Thr Leu Val Arg Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 29

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HCDR3
<400> 29
Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr
1 5
<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HCDR3
<400> 30
Trp Gly Asn Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR1
<400> 31
Gly Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR1
<400> 32
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1

<400> 33

Arg Ser Ser Gln Ser Phe Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
1 5 10 15

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1

<400> 34

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1

<400> 35

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1

<400> 36

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1

<400> 37

Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1

<400> 38

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1

<400> 39

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Ser Thr Val Ala
 1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR2

<400> 41

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 42

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2
<400> 42
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2
<400> 43
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2
<400> 44
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2
<400> 45
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR2
<400> 46
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2
<400> 47
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2
<400> 48
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2
<400> 49
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LCDR2
<400> 50

Leu Thr Ser Asn Arg His Thr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 51

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 52

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 53

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 54

Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 55

Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 56

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 57

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 58

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
 <223> LCDR3
 <400> 59
 Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LCDR3
 <400> 60
 Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 61
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LAb19301 VH
 <400> 61
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Phe Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly His Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Lys Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115
 <210> 62
 <211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19302 VH

<400> 62

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

<210> 63

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19303 VH

<400> 63

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

				85					90					95		
Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				100					105					110		
Val	Ser	Ala														
				115												
<210>	64															
<211>	115															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	LAB19304	VH														
<400>	64															
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ala	Tyr	
			20						25					30		
Glu	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Val	His	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35						40					45		
Gly	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Asn	Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe	
			50						55					60		
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70						75				80	
Met	Glu	Val	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85						90				95	
Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
					100						105				110	
Val	Ser	Ala														
				115												
<210>	65															
<211>	115															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	LAB19305	VH														
<400>	65															
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ala	Tyr	
			20						25					30		

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val Tyr Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala
 115

<210> 66

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19306 VH

<400> 66

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

<210> 67

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19307 VH

<400> 67

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

<210> 68

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19308 VH

<400> 68

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

	100		105		110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala					
	115		120		
<210> 69					
<211> 115					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> LAb19309 VH					
<400> 69					
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala					
1	5		10		15
Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr					
	20		25		30
Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe					
	50		55		60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
65	70		75		80
Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr					
	100		105		110
Val Ser Ala					
	115				
<210> 70					
<211> 120					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> LAb19310 VH					
<400> 70					
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Pro					
1	5		10		15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Val Ser					
	20		25		30
Pro Met Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45

Gly Leu Ile His Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Gly Asn Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19301 VL

<400> 71

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Gly Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His 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 Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19302 VL

<400> 72

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

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

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19303 VL

<400> 73

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Phe Val His Ser			
	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln 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 Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly			
	85	90	95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19304 VL

<400> 74

Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Thr	Ile	Val	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	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	Lys	Ile
65				70						75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Val
				85					90					95	
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100						105					110	

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19305 VL

<400> 75

Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Thr	Ile	Val	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	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	Lys	Ile
65				70						75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Val
				85					90					95	
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100						105					110	

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19306 VL

<400> 76

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25						30	
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	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	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser
					85					90					95
Thr	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
					100					105					110

<210> 77

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19307 VL

<400> 77

Asp	Val	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Gln	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20						25					30	
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	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	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser
					85					90					95
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys

	100	105	110
<210>	78		
<211>	112		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	LAb19308 VL		
<400>	78		
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His 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 Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser			
	85	90	95
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110

<210> 79

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19309 VL

<400> 79

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser			
	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu 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 Tyr Cys Phe Gln Val
 85 90 95

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

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19310 VL

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Ser Thr
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Thr Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 81

<211> 248

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19301 scFv

<400> 81

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Gly Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His 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 Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro
 130 135 140
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Phe Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly His Lys Leu
 165 170 175
 Glu Trp Met Gly Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro
 180 185 190
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 195 200 205
 Phe Phe Leu Gln Leu Lys Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 245

<210> 82

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19302 scFv

<400> 82

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

<210> 83

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19303 scFv

<400> 83

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

<210> 84

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19304 scFv

<400> 84

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

<210> 85

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19305 scFv

<400> 85

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

```

<210> 86

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19306 scFv

<400> 86

```

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

<210> 87

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19307 scFv

<400> 87

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

<210> 88

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19308 scFv

<400> 88

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

<210> 89

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19309 scFv

<400> 89

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

<210> 90

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LAb19310 scFv

<400> 90

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

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

<210> 91

<211> 473

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LIC19301 CAR

<400> 91

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

50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr	Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu	Asp Leu Gly Val Tyr	Phe Cys Ser Gln Ser
85	90	95
Thr His Phe Pro Phe Thr	Phe Gly Ser Gly Thr	Lys Leu Glu Ile Lys
100	105	110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser	Gly Lys Pro Gly Ser	Gly Glu Gly Ser Thr
115	120	125
Lys Gly Asp Val Gln Leu	Gln Glu Ser Gly Pro	Asp Leu Val Lys Pro
130	135	140
Ser Gln Ser Leu Ser Leu	Thr Cys Thr Val Thr	Gly Tyr Ser Ile Thr
145	150	155
Ser Gly Phe Ser Trp His	Trp Ile Arg Gln Phe	Pro Gly His Lys Leu
165	170	175
Glu Trp Met Gly Phe Met	Gln Tyr Ser Gly Asn	Thr Asn Tyr Asn Pro
180	185	190
Ser Leu Lys Ser Arg Ile	Ser Phe Thr Arg Asp	Thr Ser Lys Asn Gln
195	200	205
Phe Phe Leu Gln Leu Lys	Ser Val Thr Pro Glu	Asp Thr Ala Thr Tyr
210	215	220
Tyr Cys Ala Arg Arg Glu	Glu Gly Ala Trp Phe	Ala Tyr Trp Gly Gln
225	230	235
Gly Thr Leu Val Thr Val	Ser Ala Thr Ser Thr	Thr Thr Pro Ala Pro
245	250	255
Arg Pro Pro Thr Pro Ala	Pro Thr Ile Ala Ser	Gln Pro Leu Ser Leu
260	265	270
Arg Pro Glu Ala Cys Arg	Pro Ala Ala Gly Gly	Ala Val His Thr Arg
275	280	285
Gly Leu Asp Phe Ala Cys	Asp Ile Tyr Ile Trp	Ala Pro Leu Ala Gly
290	295	300
Thr Cys Gly Val Leu Leu	Leu Ser Leu Val Ile	Thr Leu Tyr Cys Lys
305	310	315
Arg Gly Arg Lys Lys Leu	Leu Tyr Ile Phe Lys	Gln Pro Phe Met Arg
325	330	335
Pro Val Gln Thr Thr Gln	Glu Glu Asp Gly Cys	Ser Cys Arg Phe Pro
340	345	350
Glu Glu Glu Glu Gly Gly	Cys Glu Leu Arg Val	Lys Phe Ser Arg Ser
355	360	365

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 370 375 380
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 385 390 395 400
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 405 410 415
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 420 425 430
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 435 440 445
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 450 455 460
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 <210> 92
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LIC19302 CAR
 <400> 92
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Val 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 Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro
 130 135 140

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

450	455	460
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
465	470	475
<210> 93		
<211> 470		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> LIC19303 CAR		
<400> 93		
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly		
1	5	10
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Phe Val His Ser		
	20	25
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
	35	40
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
	50	55
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly		
	85	90
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr		
	115	120
Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro		
	130	135
Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn		
145	150	155
Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu		
	165	170
Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Ala Thr Ala Tyr Asn Gln		
	180	185
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr		
	195	200
Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	210	215
Tyr Cys Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		

225	230	235	240
Val Thr Val Ser Ala	Thr Ser Thr Thr Thr	Pro Ala Pro Arg Pro	Pro
	245	250	255
Thr Pro Ala Pro Thr	Ile Ala Ser Gln	Pro Leu Ser Leu Arg	Pro Glu
	260	265	270
Ala Cys Arg Pro Ala	Ala Gly Gly Ala Val His	Thr Arg Gly Leu Asp	
	275	280	285
Phe Ala Cys Asp Ile	Tyr Ile Trp Ala Pro	Leu Ala Gly Thr Cys	Gly
	290	295	300
Val Leu Leu Leu Ser	Leu Val Ile Thr Leu	Tyr Cys Lys Arg Gly	Arg
305	310	315	320
Lys Lys Leu Leu Tyr	Ile Phe Lys Gln Pro	Phe Met Arg Pro Val	Gln
	325	330	335
Thr Thr Gln Glu Glu	Asp Gly Cys Ser Cys	Arg Phe Pro Glu Glu	Glu
	340	345	350
Glu Gly Gly Cys Glu	Leu Arg Val Lys Phe	Ser Arg Ser Ala Asp	Ala
	355	360	365
Pro Ala Tyr Gln Gln	Gly Gln Asn Gln Leu	Tyr Asn Glu Leu Asn	Leu
	370	375	380
Gly Arg Arg Glu Glu	Tyr Asp Val Leu Asp	Lys Arg Arg Gly Arg	Asp
385	390	395	400
Pro Glu Met Gly Gly	Lys Pro Arg Arg Lys	Asn Pro Gln Glu Gly	Leu
	405	410	415
Tyr Asn Glu Leu Gln	Lys Asp Lys Met Ala	Glu Ala Tyr Ser Glu	Ile
	420	425	430
Gly Met Lys Gly Glu	Arg Arg Arg Gly Lys	Gly His Asp Gly Leu	Tyr
	435	440	445
Gln Gly Leu Ser Thr	Ala Thr Lys Asp Thr	Tyr Asp Ala Leu His	Met
	450	455	460
Gln Ala Leu Pro Pro	Arg		
465	470		
<210>	94		
<211>	470		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	LIC19304 CAR		
<400>	94		
Asp Val Leu Met Thr	Gln Thr Pro Leu Ser	Leu Pro Val Ser Leu	Gly

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

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 325 330 335
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 340 345 350
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 355 360 365
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 370 375 380
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 385 390 395 400
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 405 410 415
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 420 425 430
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 435 440 445
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 <210> 95
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LIC19305 CAR
 <400> 95
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu 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 Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 145 150 155 160
 Ala Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val Tyr Gly Leu Glu
 165 170 175
 Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln
 180 185 190
 Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 195 200 205
 Ala Tyr Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ser Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 245 250 255
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 260 265 270
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 275 280 285
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 290 295 300
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 325 330 335
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 340 345 350
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 355 360 365
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 370 375 380
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 385 390 395 400
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu

	405		410		415
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile					
	420		425		430
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr					
	435		440		445
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met					
	450		455		460
Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
465			470		
<210> 96					
<211> 475					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> LIC19306 CAR					
<400> 96					
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly					
1	5		10		15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser					
	20		25		30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His 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 Lys Ile					
65		70		75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser					
	85		90		95
Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr					
	115		120		125
Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro					
	130		135		140
Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser					
145		150		155	160
Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu					
	165		170		175
Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp					

	180		185		190
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr					
	195		200		205
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr					
	210		215		220
Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Leu Met Ile Arg Gly Trp Phe Ala Tyr Trp					
225		230		235	240
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro					
	245		250		255
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu					
	260		265		270
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His					
	275		280		285
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu					
	290		295		300
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr					
305		310		315	320
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe					
	325		330		335
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg					
	340		345		350
Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser					
	355		360		365
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr					
	370		375		380
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys					
385		390		395	400
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn					
	405		410		415
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu					
	420		425		430
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly					
	435		440		445
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr					
	450		455		460
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
465		470		475	
<210> 97					
<211> 475					

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LIC19307 CAR
 <400> 97
 Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Gln Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His 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 Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
 130 135 140
 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly
 145 150 155 160
 Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
 165 170 175
 Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser Pro Tyr Tyr Pro Gln
 180 185 190
 Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Arg Gln Asn Ile Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Phe Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Pro
 245 250 255
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 260 265 270

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 275 280 285
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 290 295 300
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 305 310 315 320
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 325 330 335
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 340 345 350
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 355 360 365
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 370 375 380
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 385 390 395 400
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 405 410 415
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 420 425 430
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 435 440 445
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 450 455 460
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470 475
 <210> 98
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LIC19308 CAR
 <400> 98
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His 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 Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
 130 135 140
 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ile
 145 150 155 160
 Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
 165 170 175
 Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp
 180 185 190
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Ser Leu Ser Thr Leu Val Arg Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro
 245 250 255
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 260 265 270
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 275 280 285
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 290 295 300
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 305 310 315 320
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 325 330 335
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 340 345 350
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser

355	360	365
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
370	375	380
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
385	390	395
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
405	410	415
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
420	425	430
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
435	440	445
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
450	455	460
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
465	470	475
<210> 99		
<211> 470		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> LIC19309 CAR		
<400> 99		
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Leu Gly		
1	5	10
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser		
20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu 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
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val		
85	90	95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr		
115	120	125
Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro		

130	135	140													
Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr															
145	150	155	160												
Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu															
	165	170	175												
Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln															
	180	185	190												
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr															
	195	200	205												
Ala Tyr Met Glu Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr															
210	215	220													
Tyr Cys Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu															
225	230	235	240												
Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro															
	245	250	255												
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu															
	260	265	270												
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp															
275	280	285													
Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly															
290	295	300													
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg															
305	310	315	320												
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln															
	325	330	335												
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu															
	340	345	350												
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala															
355	360	365													
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu															
370	375	380													
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp															
385	390	395	400												
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu															
	405	410	415												
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile															
	420	425	430												
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr															
435	440	445													

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 <210> 100
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LIC19310 CAR
 <400> 100
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Ser Thr
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Thr Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Gln
 115 120 125
 Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Pro Ser Leu Lys
 130 135 140
 Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Val Ser Pro Met Thr
 145 150 155 160
 Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
 165 170 175
 His Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys
 180 185 190
 Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 195 200 205
 Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp
 210 215 220

Gly Asn Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 245 250 255
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 260 265 270
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 275 280 285
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 290 295 300
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 325 330 335
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 340 345 350
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 355 360 365
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 370 375 380
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 385 390 395 400
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 405 410 415
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 420 425 430
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 435 440 445
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 <210> 101
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD8 α 信号肽
 <400> 101

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
 20

<210> 102

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 α 铰链结构域

<400> 102

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> 103

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 α 跨膜结构域

<400> 103

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

<210> 104

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD137胞内结构域

<400> 104

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> 105

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3ζ胞内结构域

<400> 105

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 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> 106

<211> 541

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GPC3融合蛋白

<400> 106

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

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

Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly
 405 410 415
 Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu
 420 425 430
 Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu
 435 440 445
 Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu
 450 455 460
 Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu
 465 470 475 480
 Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
 485 490 495
 Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
 500 505 510
 Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
 515 520 525
 His Asn Leu Gly Asn Val His His His His His His
 530 535 540
 <210> 107
 <211> 494
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LIC19301 CAR
 <400> 107
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Gly Ser Ser Gln
 35 40 45
 Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser
 130 135 140
 Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 145 150 155 160
 Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr
 165 170 175
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Phe Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe
 180 185 190
 Pro Gly His Lys Leu Glu Trp Met Gly Phe Met Gln Tyr Ser Gly Asn
 195 200 205
 Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp
 210 215 220
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Lys Ser Val Thr Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu Glu Gly Ala Trp Phe
 245 250 255
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr
 260 265 270
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 275 280 285
 Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 290 295 300
 Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 305 310 315 320
 Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 325 330 335
 Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 340 345 350
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 355 360 365
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 370 375 380
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 385 390 395 400
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

	405		410		415
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg					
	420		425		430
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys					
	435		440		445
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg					
	450		455		460
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys					
465		470		475	480
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
	485		490		
<210> 108					
<211> 496					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> LIC19302 CAR					
<400> 108					
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu					
1	5		10		15
His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu					
	20		25		30
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln					
	35		40		45
Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln					
	50		55		60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg					
65		70		75	80
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp					
	85		90		95
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr					
	100		105		110
Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr					
	115		120		125
Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser					
	130		135		140
Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly					
145		150		155	160
Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser					

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

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495
 <210> 109
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LIC19303 CAR
 <400> 109
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 35 40 45
 Ser Phe Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser
 130 135 140
 Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Glu Ala Ser
 165 170 175
 Gly Tyr Thr Phe Asn Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro
 180 185 190
 Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Ala
 195 200 205
 Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp
 210 215 220
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu
 225 230 235 240

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

<210> 110

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LIC19304 CAR

<400> 110

305	310	315	320
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr			
	325	330	335
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe			
	340	345	350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg			
	355	360	365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser			
	370	375	380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr			
385	390	395	400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys			
	405	410	415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn			
	420	425	430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu			
	435	440	445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly			
	450	455	460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr			
465	470	475	480
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485	490	
<210> 111			
<211> 491			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> LIC19305 CAR			
<400> 111			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu			
	20	25	30
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln			
	35	40	45
Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln			
	50	55	60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg			

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

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 112

<211> 496

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LIC19306 CAR

<400> 112

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

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

450	455	460															
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala		
465					470					475					480		
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg		
				485					490						495		
<210>	113																
<211>	496																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	LIC19307 CAR																
<400>	113																
Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu		
1				5					10					15			
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Val	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Gln		
			20					25					30				
Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln		
			35				40						45				
Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln		
			50			55					60						
Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg		
65					70					75					80		
Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp		
					85				90					95			
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr		
			100					105					110				
Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr		
			115				120						125				
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser		
			130				135					140					
Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly		
145					150					155					160		
Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser		
					165					170					175		
Gly	Phe	Ala	Phe	Gly	Thr	Tyr	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro		
			180					185					190				
Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Ser		
			195				200						205				
Pro	Tyr	Tyr	Pro	Gln	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp		

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

<210> 114

<211> 496

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LIC19308 CAR

<400> 114

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

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
 290 295 300
 Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr
 305 310 315 320
 Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 325 330 335
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
 340 345 350
 Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
 355 360 365
 Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 370 375 380
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 385 390 395 400
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 405 410 415
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 420 425 430
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 435 440 445
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 450 455 460
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 465 470 475 480
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495

<210> 115

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LIC19309 CAR

<400> 115

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

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

355	360	365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
370	375	380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
385	390	395
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
405	410	415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
420	425	430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
435	440	445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
450	455	460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
465	470	475
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
485	490	
<210> 116		
<211> 490		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> LIC19310 CAR		
<400> 116		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met		
20	25	30
Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln		
35	40	45
Asn Val Arg Ser Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
50	55	60
Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro		
65	70	75
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
85	90	95
Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His		
100	105	110
Trp Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		

115	120	125
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr		
130	135	140
Lys Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro		
145	150	155
Gly Pro Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr		
165	170	175
Val Ser Pro Met Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu		
180	185	190
Trp Ile Gly Leu Ile His Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln		
195	200	205
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr		
210	215	220
Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr		
225	230	235
Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Asn Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp		
245	250	255
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro		
260	265	270
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
275	280	285
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
290	295	300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
305	310	315
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		
325	330	335
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
340	345	350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
355	360	365
Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
370	375	380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
385	390	395
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
405	410	415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
420	425	430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 485 490

<210> 117

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 9VH1

<400> 117

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

<210> 118

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 9VH2

<400> 118

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

1	5	10	15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Glu Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe			
	50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Thr Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
	100	105	110
Val Ser Ser			
	115		
<210> 119			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 9VH3			
<400> 119			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe			
	50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
	100	105	110
Val Ser Ser			
	115		
<210> 120			

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5VH1

<400> 120

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

<210> 121

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5VH2

<400> 121

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 122

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5VH3

<400> 122

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 123

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL1

<400> 123

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser

	20		25		30														
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser				
	35						40				45								
Pro	Arg	Arg	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	Lys	Ile				
65				70						75					80				
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Val				
			85					90					95						
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
		100					105						110						

<210> 124

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL2

<400> 124

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

<210> 125

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL3

<400> 125

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 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 Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 126

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hIgKCL

<400> 126

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
 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> 127

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hIgG1CH

<400> 127

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	Cys	Pro	Pro	Cys
			100							105					110
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115							120					125
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130				135					140			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145						150					155				160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165							170					175
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180							185					190
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200								205
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210				215								220
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230						235				240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245							250					255
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260							265					270
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275					280							285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 128
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LAb9VH1VL3 scFv
 <400> 128
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 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 Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 145 150 155 160
 Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu
 165 170 175
 Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln
 180 185 190
 Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr
 195 200 205

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 129
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LAb9VH3VL2 scFv
 <400> 129

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

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 130
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> huLIC19309a CAR
 <400> 130
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu
 20 25 30
 Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln
 35 40 45
 Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser
 130 135 140
 Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 165 170 175
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 180 185 190
 Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn
 195 200 205

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

<210> 131

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huLIC19309b CAR (H93 CAR)

<400> 131

```

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

```

275	280	285
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
290	295	300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
305	310	315
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		
	325	330
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
	340	350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
	355	365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
	370	380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
	385	395
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
	405	410
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
	420	430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
	435	445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
	450	460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
	465	475
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
	485	490

<210> 132

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> "whitlow"接头

<400> 132

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

Lys Gly

<210> 133

<211> 962

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H93M CAR氨基酸

<400> 133

```

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

```

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
305 310 315 320

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
325 330 335

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460

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

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Val Asn Gly Ser Gly
485 490 495

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
500 505 510

Pro Gly Pro Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu
515 520 525

Val Phe Leu Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp
530 535 540

Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met
545 550 555 560

Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr
565 570 575

Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile

	580		585		590
Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly					
	595		600		605
Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp					
	610		615		620
Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn					
625		630		635	640
Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr					
	645		650		655
Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys					
	660		665		670
Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala					
	675		680		685
Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr					
	690		695		700
Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser					
705		710		715	720
Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu					
	725		730		735
Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro					
	740		745		750
Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu					
	755		760		765
Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe					
	770		775		780
Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys					
785		790		795	800
Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg					
	805		810		815
Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser					
	820		825		830
Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Gly Ser Gly Glu Gly					
	835		840		845
Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro					
	850		855		860
Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Trp Thr Ser Pro					
865		870		875	880
Ala Pro Thr Leu Ser Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser					
	885		890		895

Val Thr Gln Lys Pro Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr
 900 905 910
 Leu Leu Ile Lys Asp Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr
 915 920 925
 Leu Arg Gly Arg Gln Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu
 930 935 940
 Arg Ile Ile Gln Arg Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg
 945 950 955 960
 Ser Ser
 <210> 134
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IL12p40-T2A-CCL-19
 <400> 134
 Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30
 Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
 35 40 45
 Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
 50 55 60
 Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
 65 70 75 80
 Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
 85 90 95
 Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
 100 105 110
 Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
 115 120 125
 Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
 130 135 140
 Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
 165 170 175
 Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu

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

<210> 135

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人IL12p40

<400> 135

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

gaggtgaaga agcctggagc cagcgtgaag gtgtcctgta aggctctgg ctacaccttc 540
acagactatg agatgcactg ggtgcggcag gcaaccggac agggcctgga gtggatggga 600
ggaatcgacc cagagacagg caacacagcc tactcccaga agtttaaggg ccgggtgacc 660
atgacaagaa ataccagcat ctccacagcc tatatggagc tgtctagcct gagatctgag 720
gatacagccg tgtactattg tgctcgctac tattcctttg cctactgggg acaggggaca 780
ctggtcaccg tctcatcaac tagtaccag acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 840
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 900
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gctgtgata tctacatctg ggcgcccttg 960
gccgggactt gtggggctct tctctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc 1020
agaaagaaac tcctgtatat attcaaaca ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat 1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1260
gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaacctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320
ctgcagaaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcgg 1380
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440
gacgcccttc acatgcagge cctgccccct cgcgttaacg gcagcggagc taaaacttc 1500
agtcttctaa aacaggctgg tgacgtggag gagaatcccg gccctatgtg ccatcagcag 1560
ctggtcattt ctgtgttctc tctggtgttt ctggctagtc ctctggtcgc tatttgggaa 1620
ctgaaaaaag atgtgtacgt ggtggagctg gactggtatc cagatgcacc aggagagatg 1680
gtggtgctga cctgcgacac acccgaggag gatggcatca cctggacact ggaccagagc 1740
tccgaggtgc tgggaagcgg caagaccctg acaatccagg tgaaggagt cggcgatgcc 1800
ggccagtaca catgtcaciaa gggcggcgag gtgctgtctc acagcctgct gctgctgcac 1860
aagaaggagg acggcatctg gtccacagac atcctgaagg atcagaagga gcctaagaac 1920
aagaccttc tcgggtgca ggccaagaat tattctggcc ggttcacctg ttggtggctg 1980
accacaatct ctaccgacct gacctcagc gtgaagtcta gccggggctc ctctgatcca 2040
cagggagtga catgcggagc agccacctg agcgcggagc gggtagagg cgacaacaag 2100
gagtacgagt atagcgtgga gtgccaggag gattccgctt gtccagcagc agaggagtcc 2160
ctgcctatcg aagtgatggt ggacgccgtg cacaagctga agtacgagaa ttatacaagc 2220
tccttcttta tcaggacat catcaagcca gatcccccta agaacctgca gctgaagccc 2280
ctgaagaatt cccgccaggt ggaggtgtct tgggagtacc ctgatacctg gtccacacca 2340
cacagctatt tctccctgac cttttgcgtg caggtgcagg gcaagtctaa gagggagaag 2400
aaggaccgcg tgttcaccga taagacaagc gccacctga tctgtcggaa gaacgcctcc 2460
atctctgtgc gggctcagga ccgatattac tcatcatcat ggagtgaatg ggcctcagtg 2520
ccttgctcag gcagtggaga gggcagagga agtctgctaa catgcgggtga cgtcagagg 2580
aatcctggcc caatggctct gctgctggca ctgagtctgc tggctctgtg gacatcacct 2640
gcacctacc tgagtggaa taatgacgct gaagattgtt gcctgagcgt gaccagaag 2700
ccaatcccc gctacatcgt gaggaacttc cactatctgc tgatcaagga cgatgcagg 2760
gtgcctgcag tgggtgttac cacactgcgg ggcagacagc tgtgcgcacc acctgatcag 2820

ccctgggtcg agagaattat tcagagactg cagcgcacct cagctaagat gaaacgccgc 2880
tcaagt 2886

<210> 138

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 138

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

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 139

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 139

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 140

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> MluI限制位点

<400> 140

acgcgt 6

<210> 141

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SpeI限制位点

<400> 141

actagt 6
 <210> 142
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> EcoRI限制位点
 <400> 142
 gaattc 6
 <210> 143
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HpaI限制位点
 <400> 143
 gttaac 6
 <210> 144
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 9VH1-hIgG1CH
 <400> 144
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115	120	125
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
130	135	140
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
145	150	155
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
165	170	175
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
180	185	190
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
195	200	205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
210	215	220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
225	230	235
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
245	250	255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
260	265	270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
275	280	285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
290	295	300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
305	310	315
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
325	330	335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
340	345	350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
355	360	365
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
370	375	380
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
405	410	415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
420	425	430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 145
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 9VH2-hIgG1CH
 <400> 145
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr																			
225					230					235									240
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser																			
					245					250									255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg																			
					260					265									270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro																			
					275					280									285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala																			
					290					295									300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val																			
305					310					315									320
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr																			
					325					330									335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr																			
					340					345									350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu																			
					355					360									365
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys																			
					370					375									380
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser																			
385					390					395									400
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp																			
					405					410									415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser																			
					420					425									430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala																			
					435					440									445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys																			
					450					455									460
<210> 146																			
<211> 464																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列																			
<220>																			
<223> 9VH3-hIgG1CH																			
<400> 146																			
Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly																			
1					5					10									15

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

	325		330		335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr					
	340		345		350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu					
	355		360		365
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys					
	370		375		380
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser					
385		390		395	400
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp					
	405		410		415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser					
	420		425		430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala					
	435		440		445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	450		455		460
<210> 147					
<211> 463					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 5VH1-hIgG1CH					
<400> 147					
Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly					
1	5		10		15
Val His Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro					
	20		25		30
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr					
	35		40		45
Ala Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu					
	50		55		60
Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln					
65		70		75	80
Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr					
	85		90		95
Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr					
	100		105		110
Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu					

115	120	125
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
130	135	140
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
145	150	155
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
165	170	175
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
180	185	190
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
195	200	205
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
210	215	220
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
225	230	235
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
245	250	255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
305	310	315
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
340	345	350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
355	360	365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
385	390	395
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
405	410	415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
420	425	430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 148
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 5VH2-hIgG1CH
 <400> 148
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 20 25 30
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 35 40 45
 Ala Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 50 55 60
 Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln
 65 70 75 80
 Asn Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr
 85 90 95
 Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115 120 125
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 130 135 140
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 180 185 190
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 195 200 205
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
225	230	235	240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
	245	250	255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
305	310	315	320
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
	325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
	340	345	350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
	355	360	365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
	370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
385	390	395	400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
	405	410	415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	420	425	430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
	435	440	445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	450	455	460
<210> 149			
<211> 463			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 5VH3-hIgG1CH			
<400> 149			
Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly			
1	5	10	15

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

	325		330		335
Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
	340		345		350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro					
	355		360		365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu					
	370		375		380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn					
385		390		395	400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser					
	405		410		415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg					
	420		425		430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu					
	435		440		445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	450		455		460
<210> 150					
<211> 238					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> VL1-hIgKCL					
<400> 150					
Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly					
1	5		10		15
Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val					
	20		25		30
Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile					
	35		40		45
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro					
	50		55		60
Gly Gln Ser Pro Arg Arg 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 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys					
	100		105		110
Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu					

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
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		
225	230	235
<210> 151		
<211> 238		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> VL2-hIgKCL		
<400> 151		
Met Gly Trp Ser Trp Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly		
1	5	10
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val		
20	25	30
Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile		
35	40	45
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro		
50	55	60
Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser		
65	70	75
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
85	90	95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys		
100	105	110
Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		
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
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
225	230	235
<210> 152		
<211> 238		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> VL3- hIgKCL		
<400> 152		
Met Gly Trp Ser Trp Ile	Leu Leu Phe Leu Leu	Ser Val Thr Ala Gly
1	5	10
Val His Ser Asp Ile Val	Met Thr Gln Ser Pro	Asp Ser Leu Ala Val
20	25	30
Ser Leu Gly Glu Arg Ala	Thr Ile Asn Cys Arg	Ser Ser Gln Thr Ile
35	40	45
Val His Ser Asn Gly Asn	Thr Tyr Leu Glu Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro
50	55	60
Gly Gln Pro Pro Lys Leu	Leu Ile Tyr Lys Val	Ser Asn Arg Phe Ser
65	70	75
Gly Val Pro Asp Arg Phe	Ser Gly Ser Gly Ser	Gly Thr Asp Phe Thr
85	90	95
Leu Thr Ile Ser Ser Leu	Gln Ala Glu Asp Val	Ala Val Tyr Tyr Cys
100	105	110
Phe Gln Val Ser His Val	Pro Tyr Thr Phe Gly	Gly Gly Thr Lys Leu
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			
225	230	235	

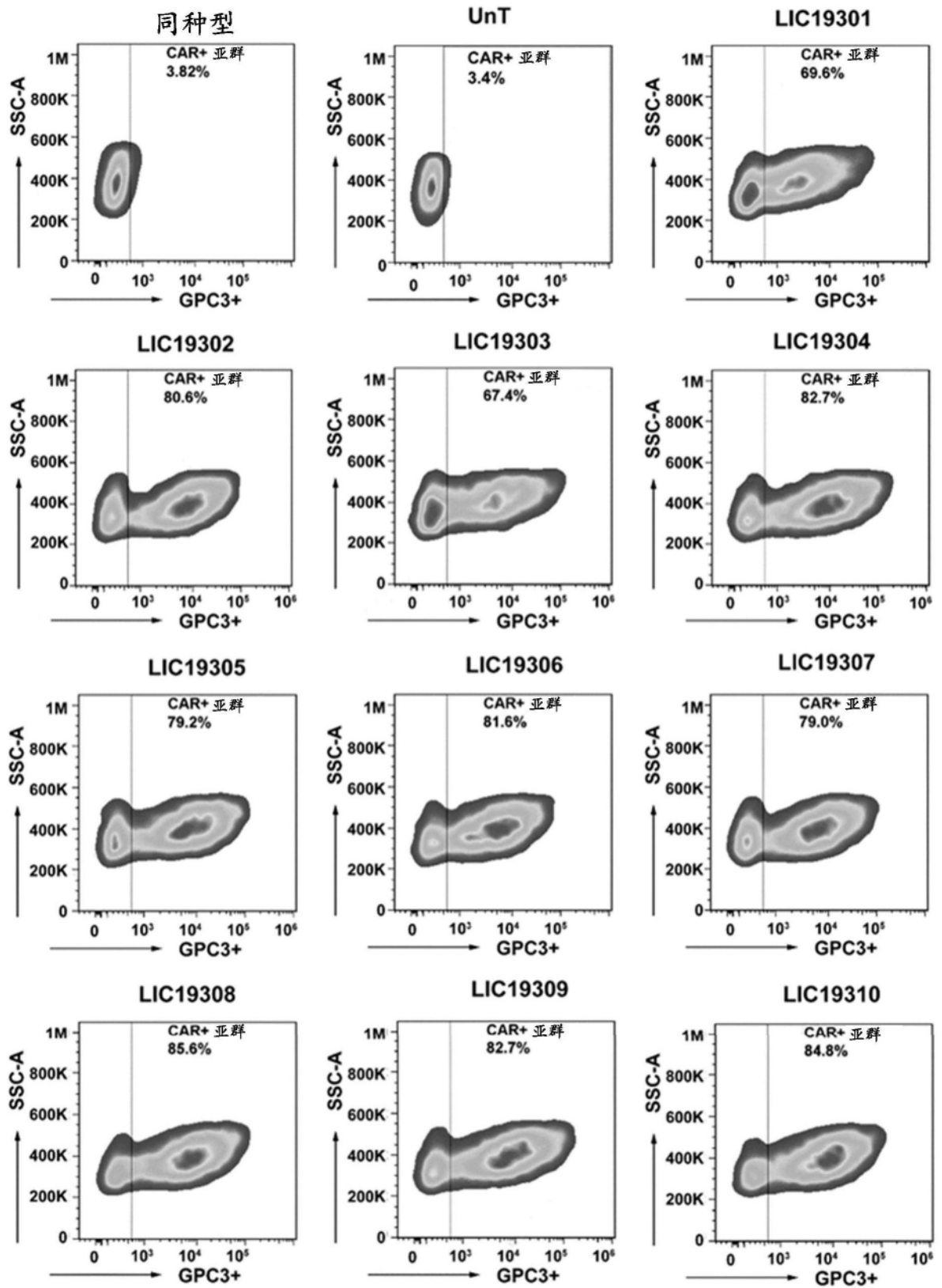


图1

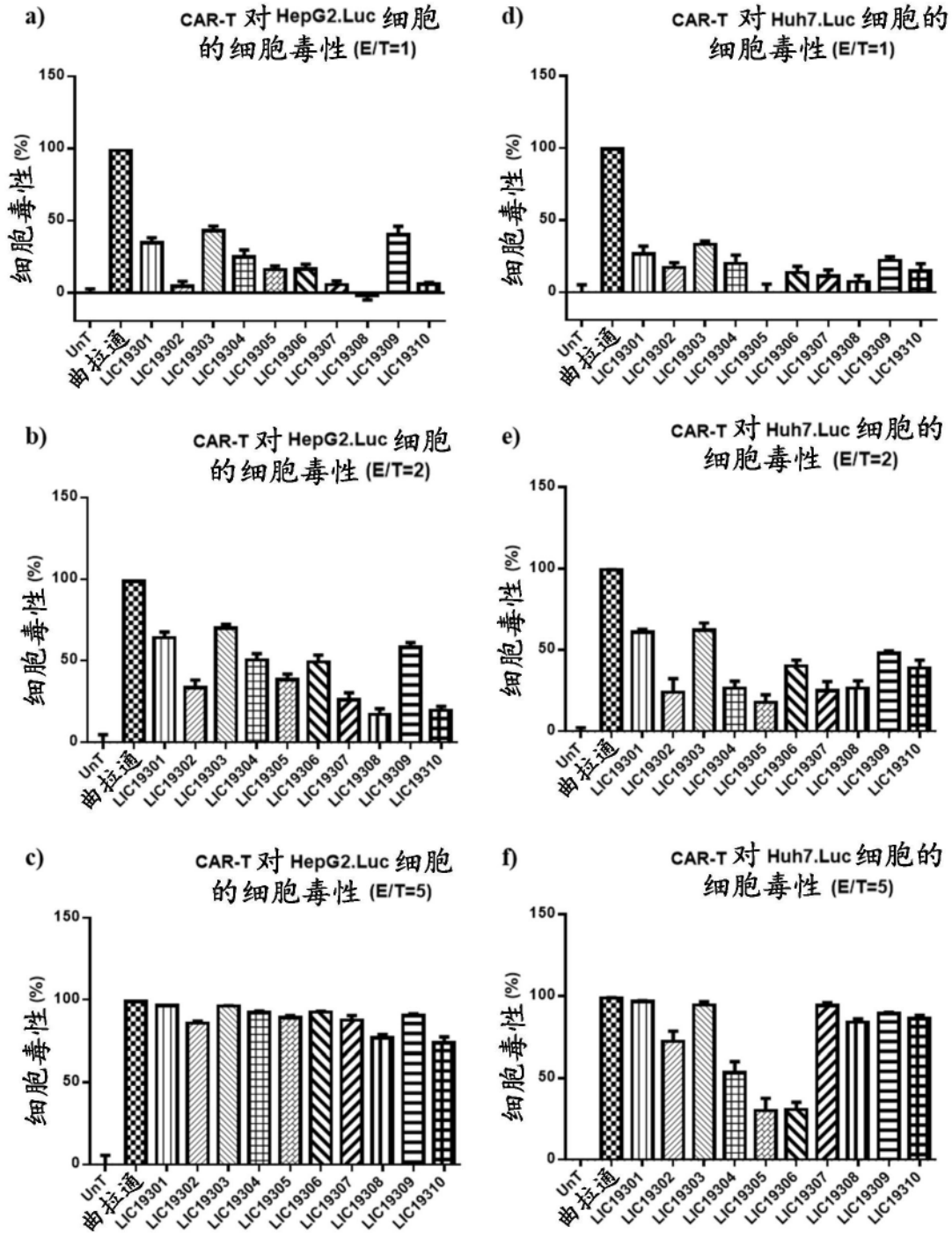


图2

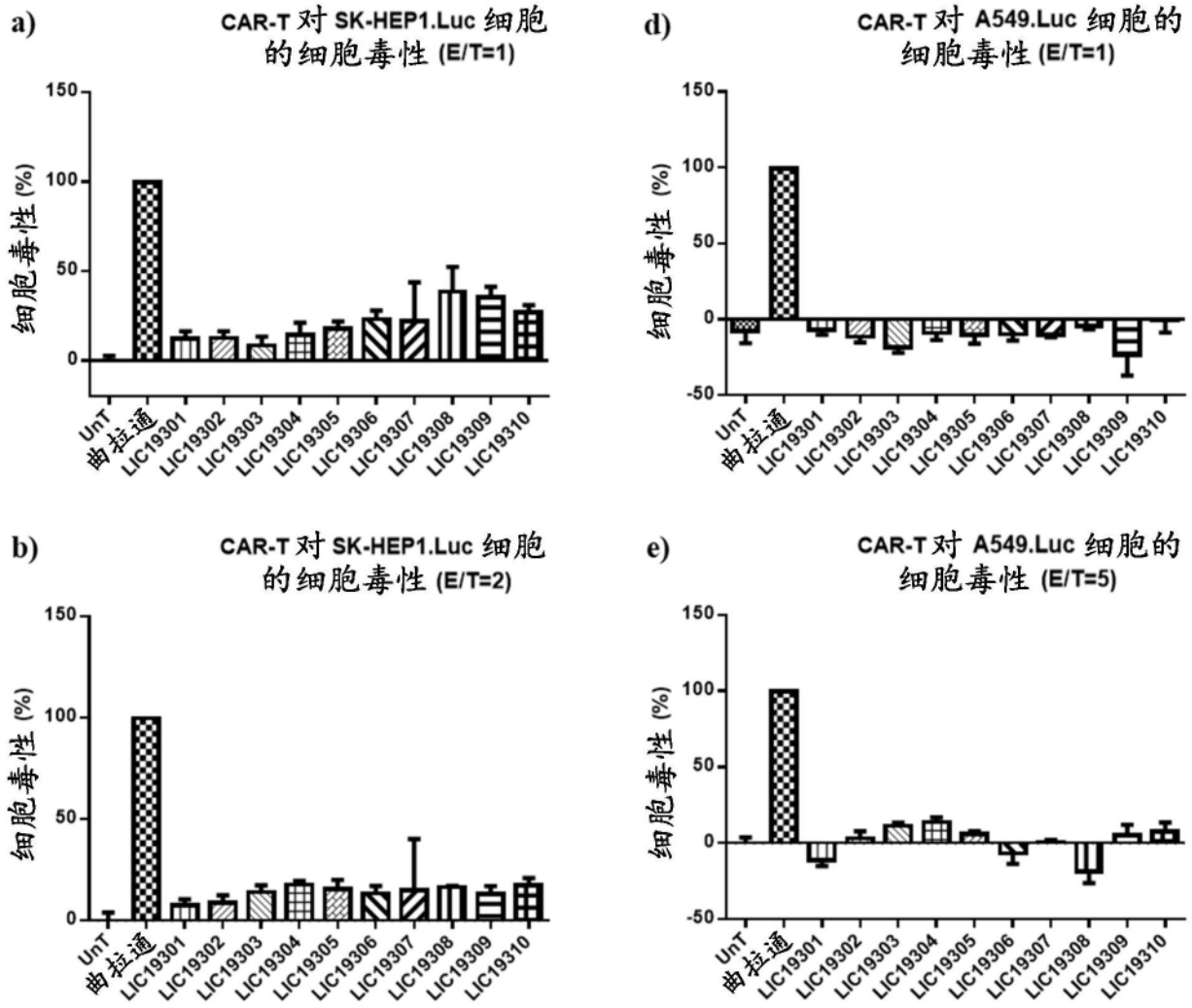
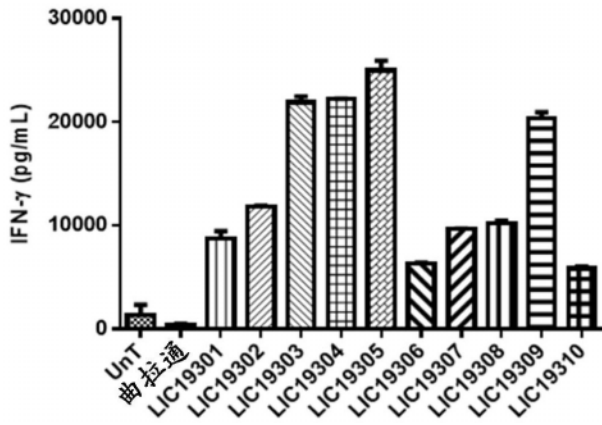
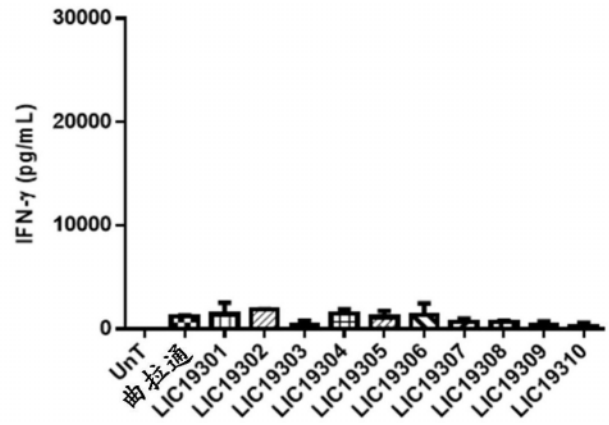


图3

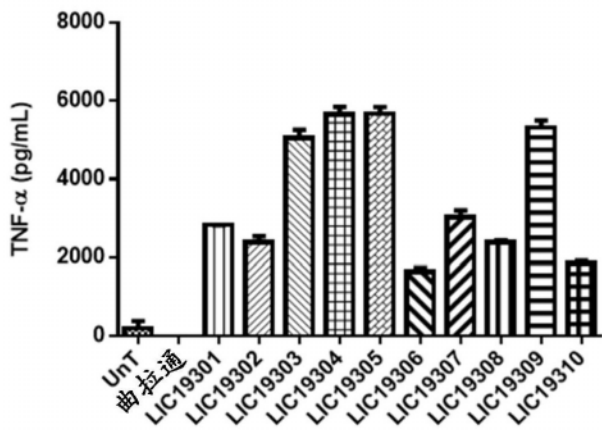
a) CAR-T 细胞与 Huh7 细胞共培养



b) CAR-T 细胞与 SK-HEP1 细胞共培养



c) CAR-T 细胞与 Huh7 细胞共培养



d) CAR-T 细胞与 SK-HEP1 细胞共培养

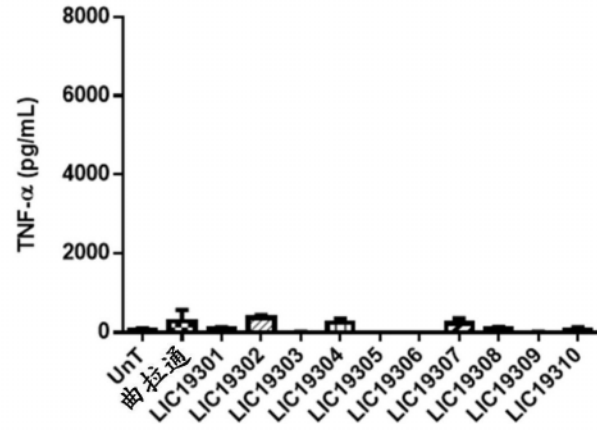


图4

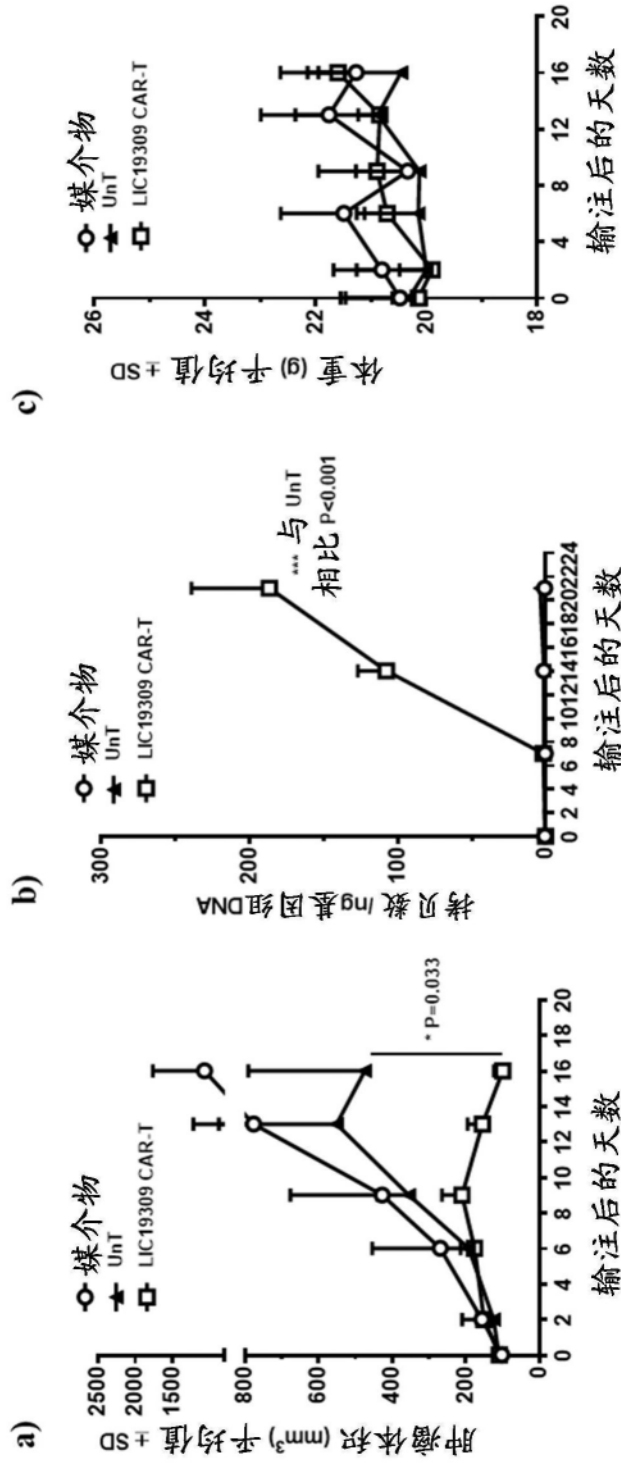


图5

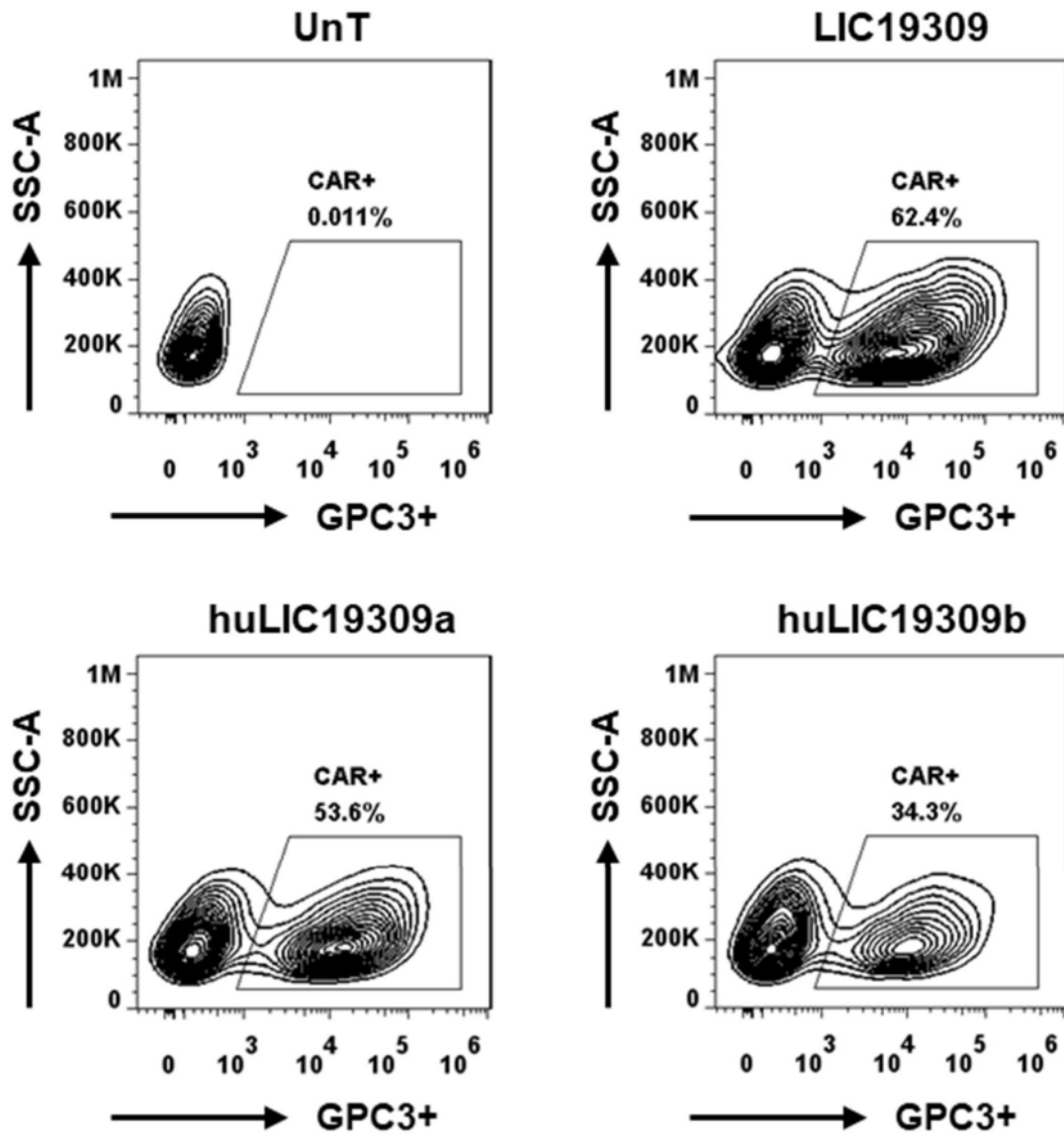


图6

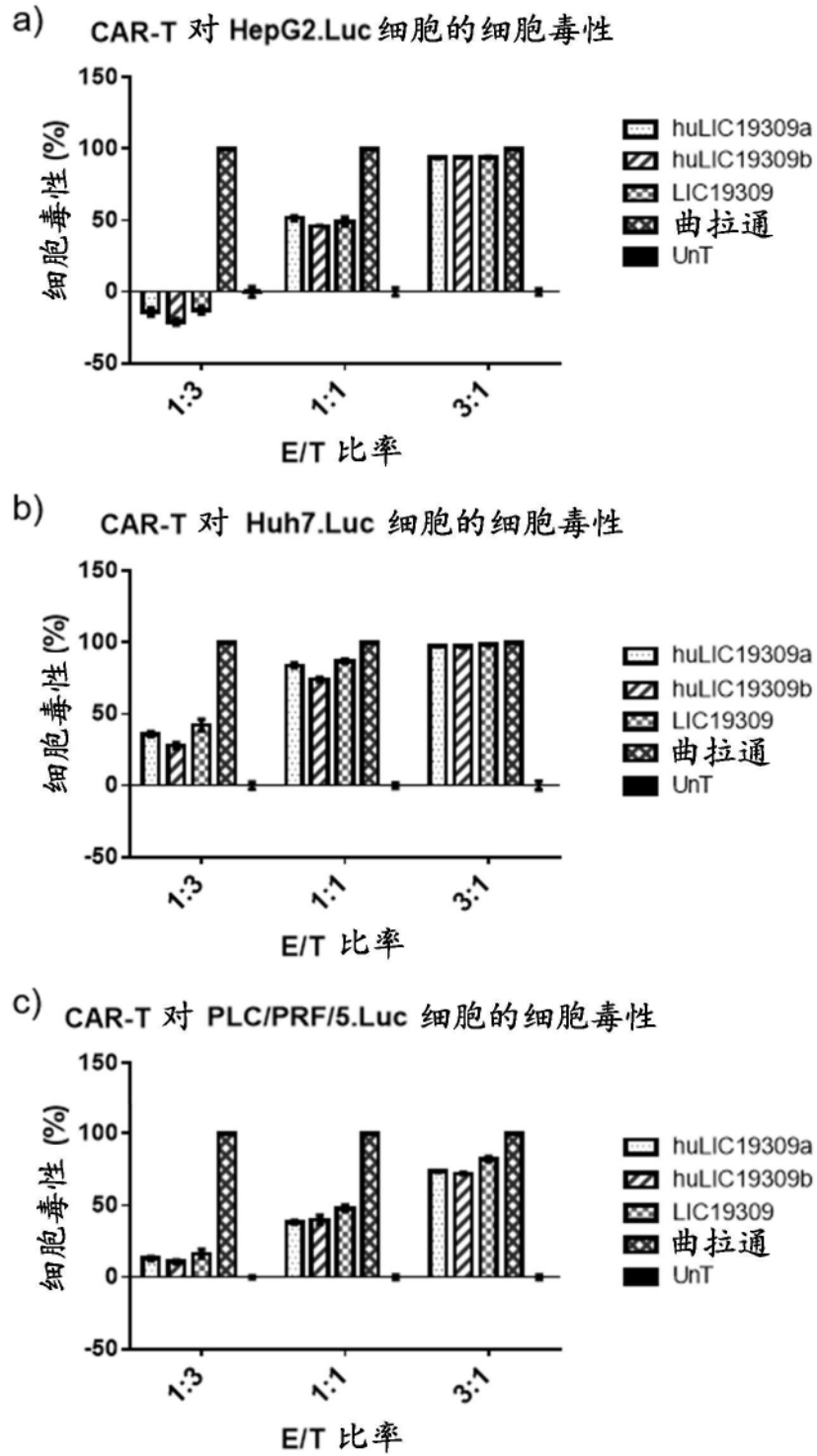


图7

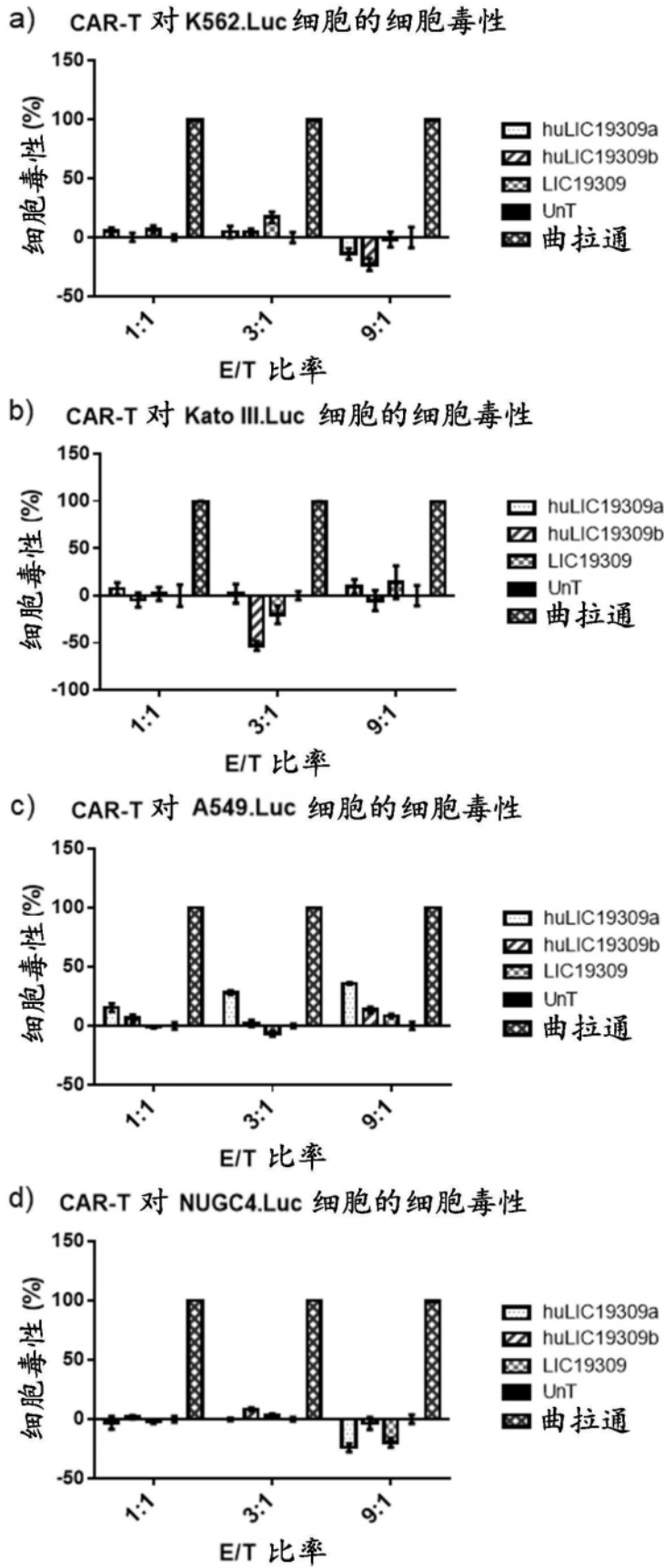


图8

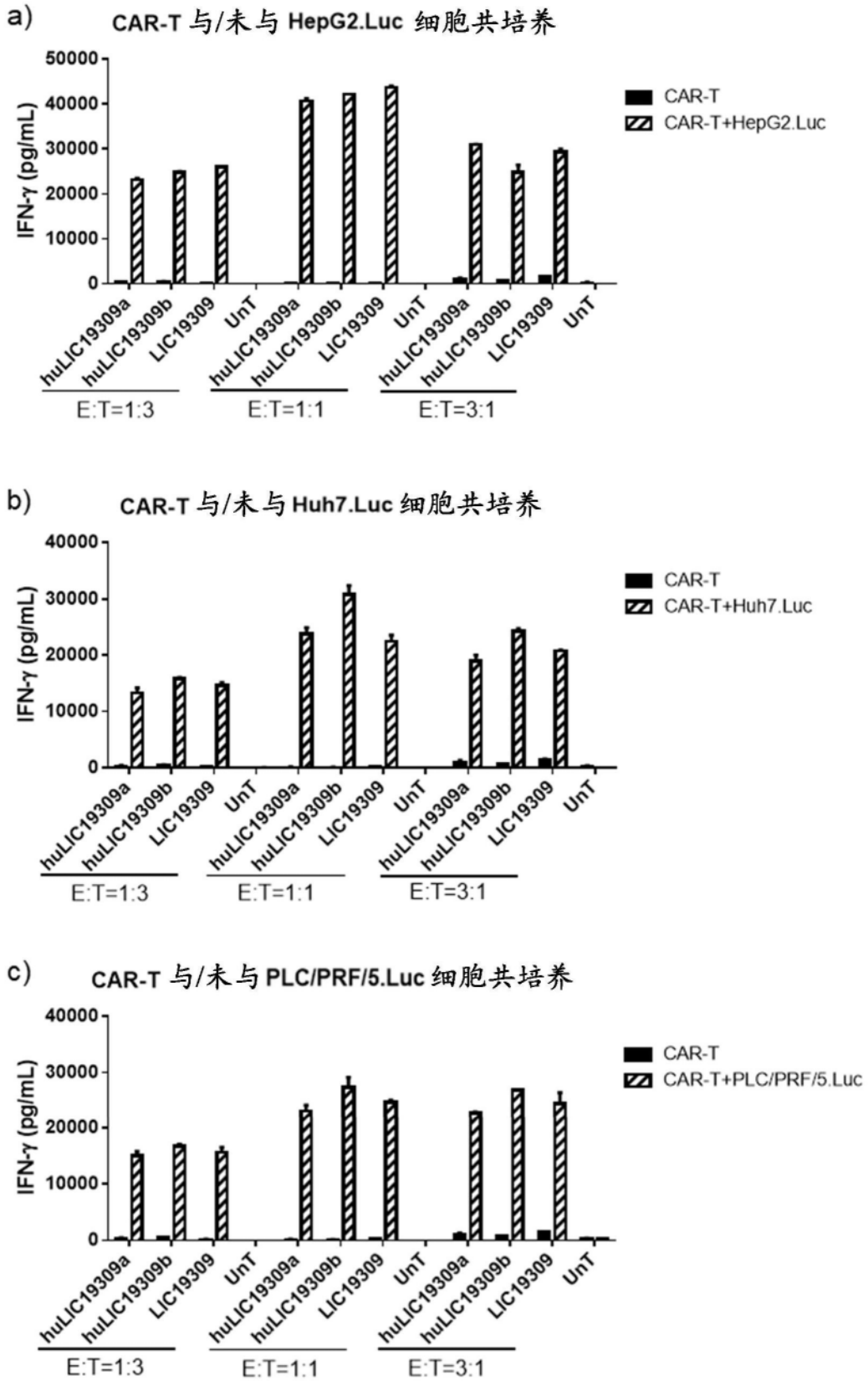


图9

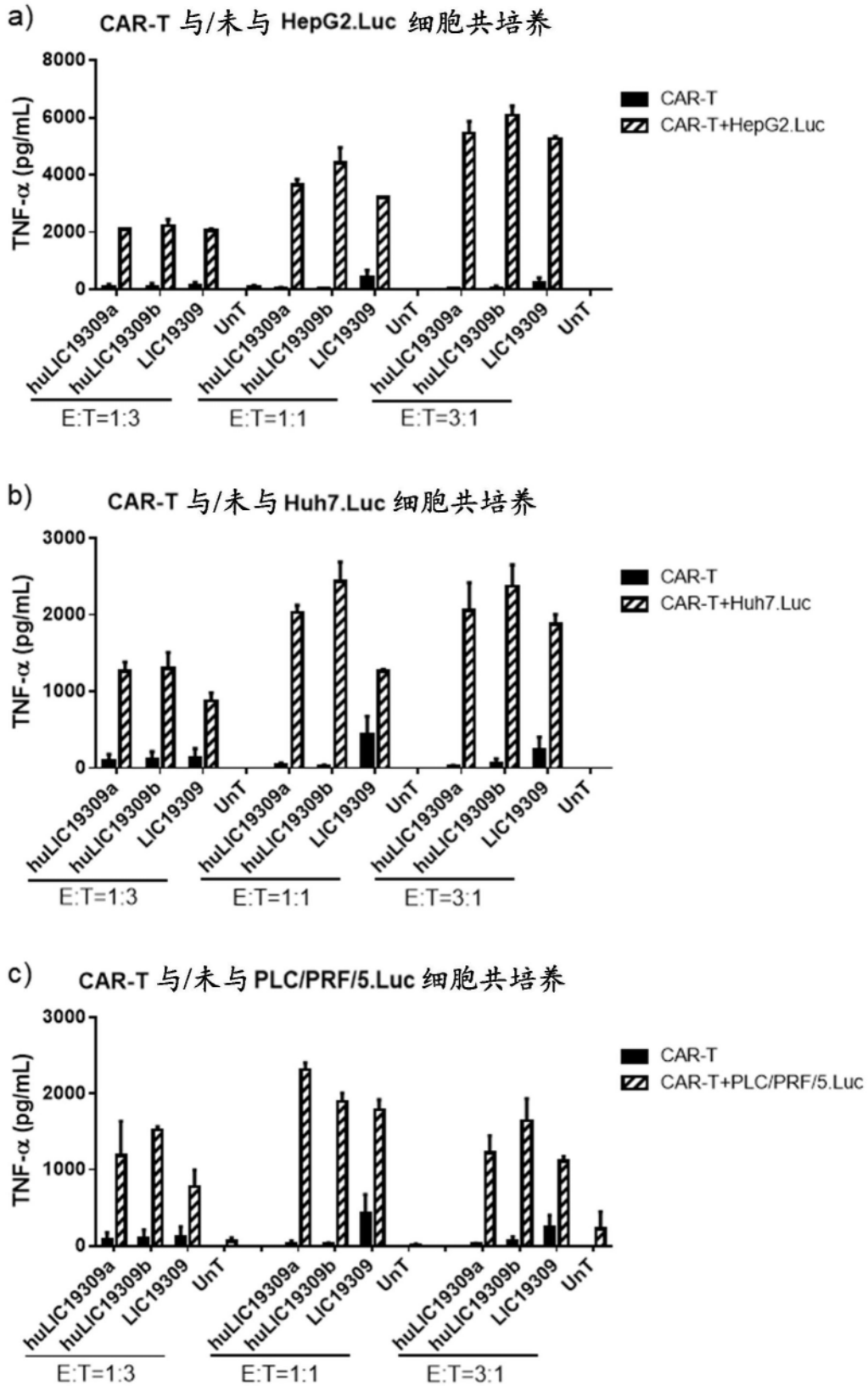


图10

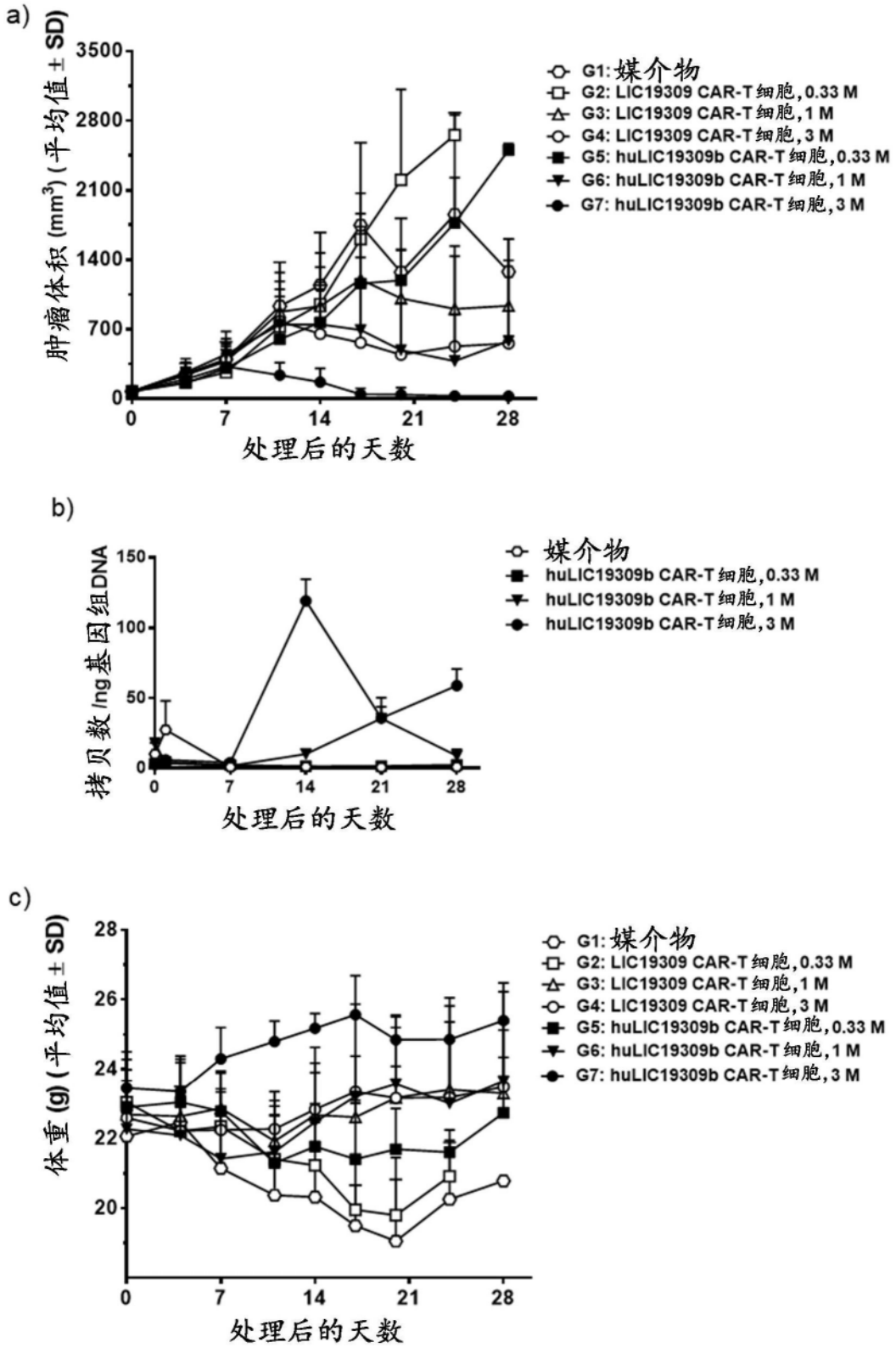
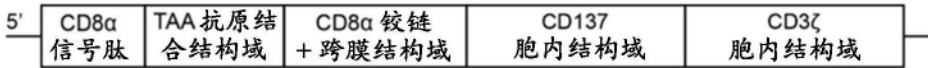


图11

H93 CAR



H93M CAR

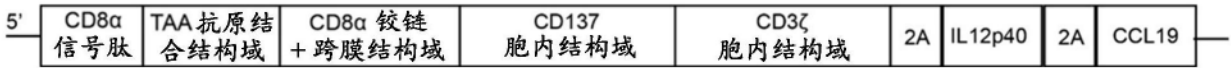


图12

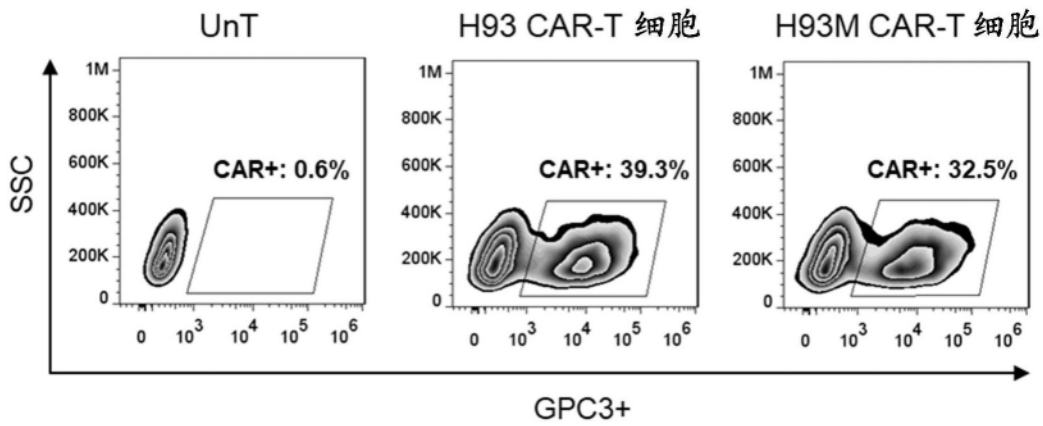


图13

IL-23 蛋白的分泌

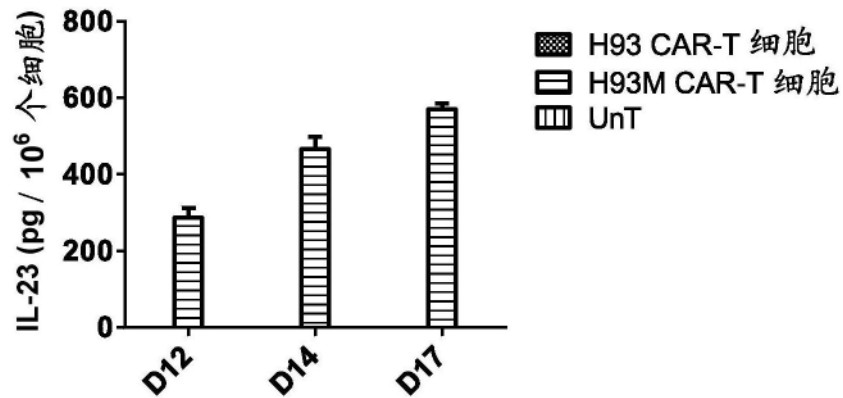


图14A

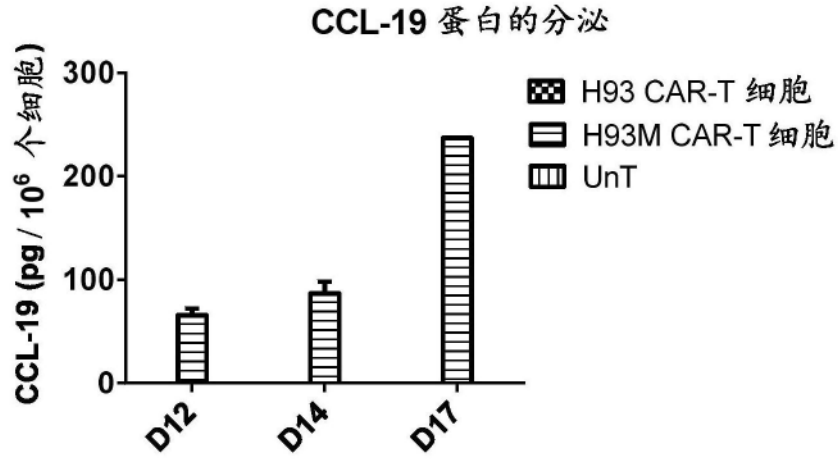


图14B

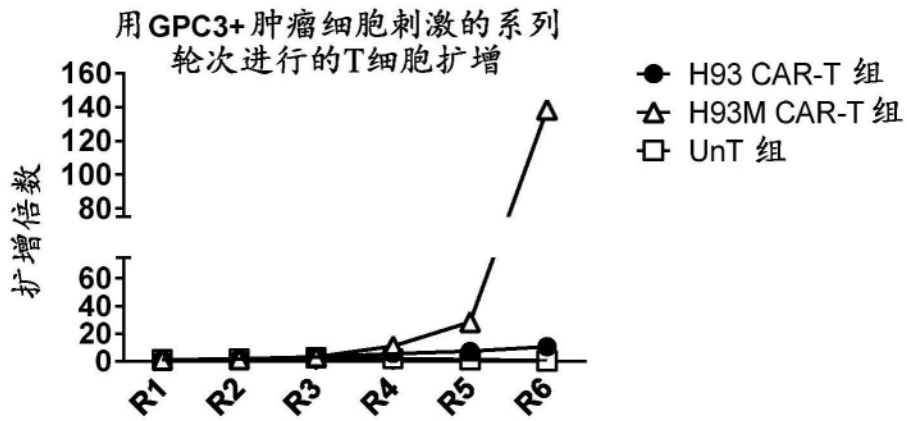


图15A

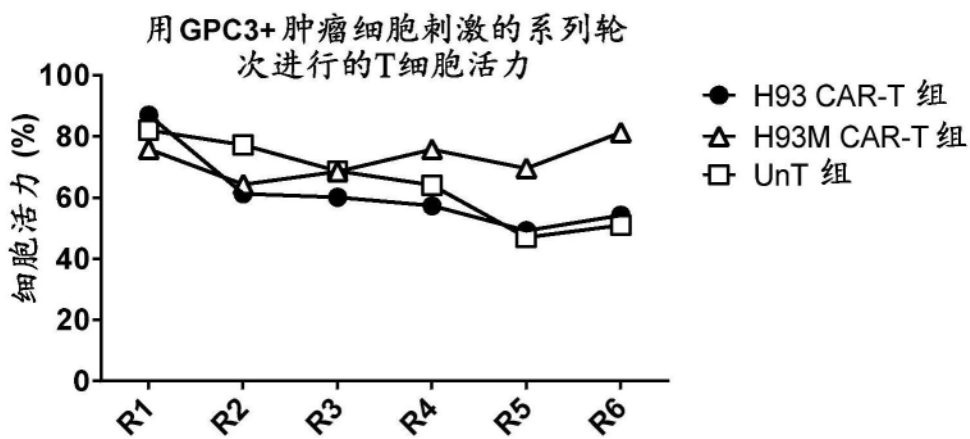


图15B

再攻击后的T细胞细胞毒性

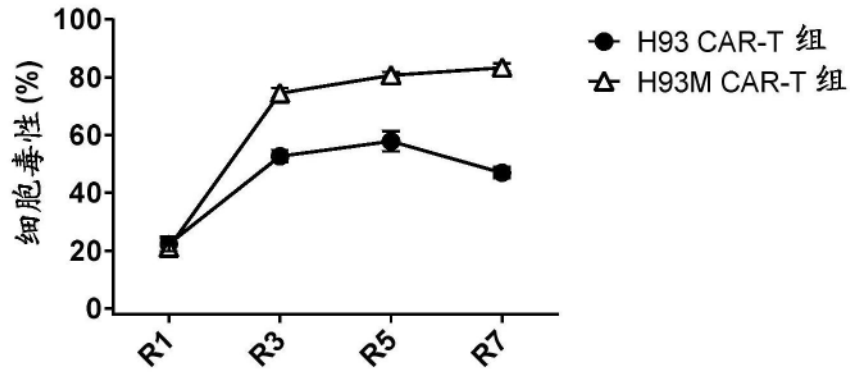


图16A

TNF- α 释放水平

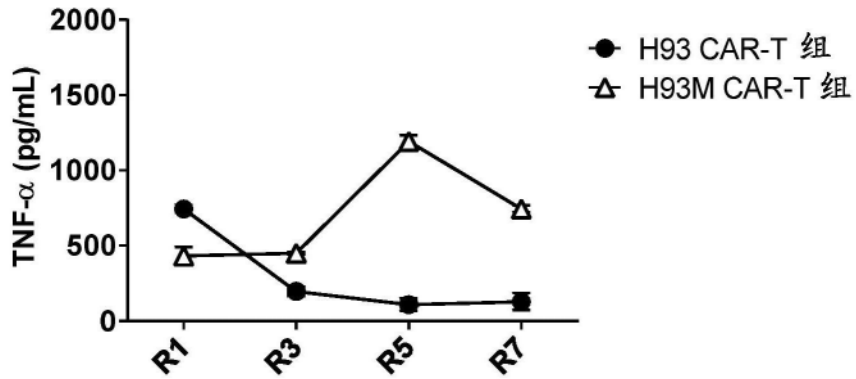


图16B

IFN- γ 释放水平

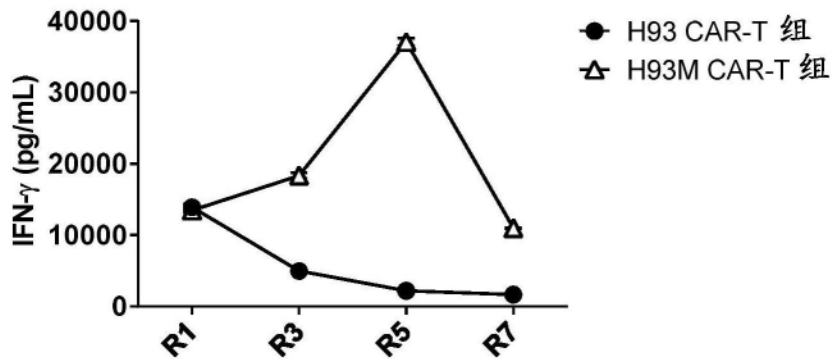


图16C

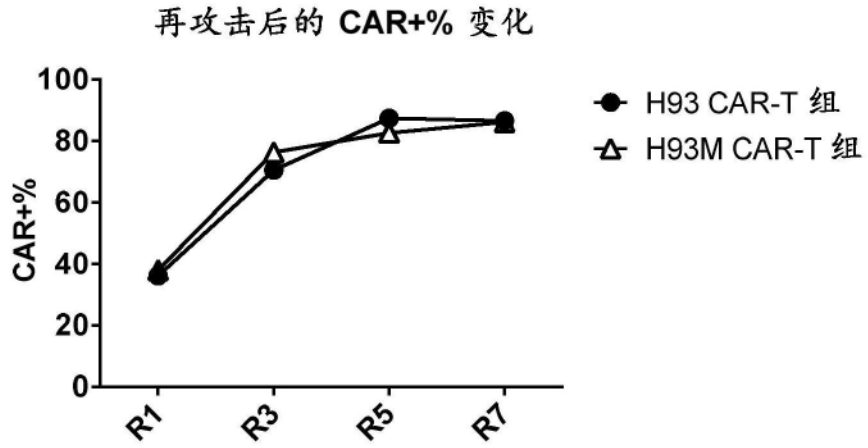


图17

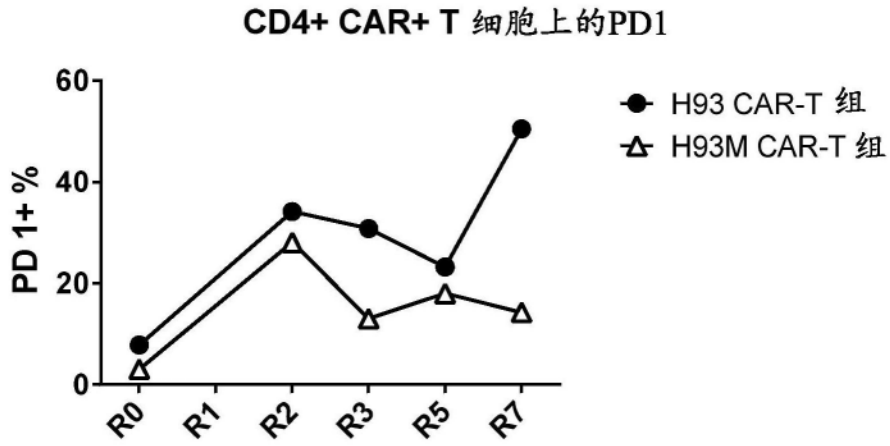


图18A

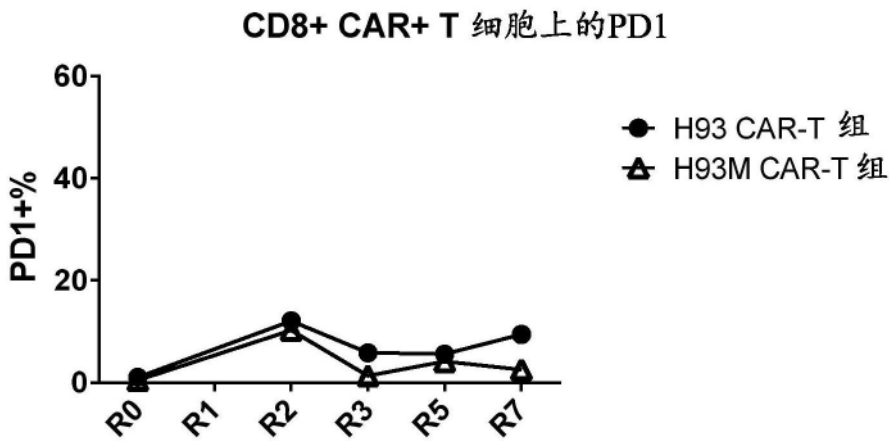


图18B

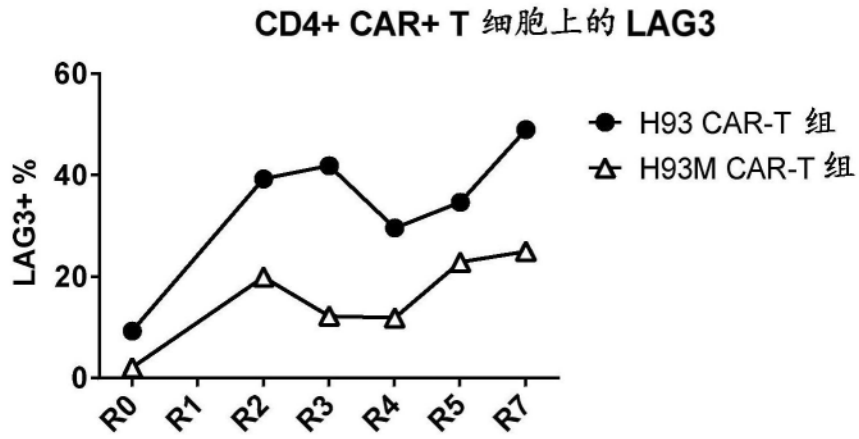


图18C

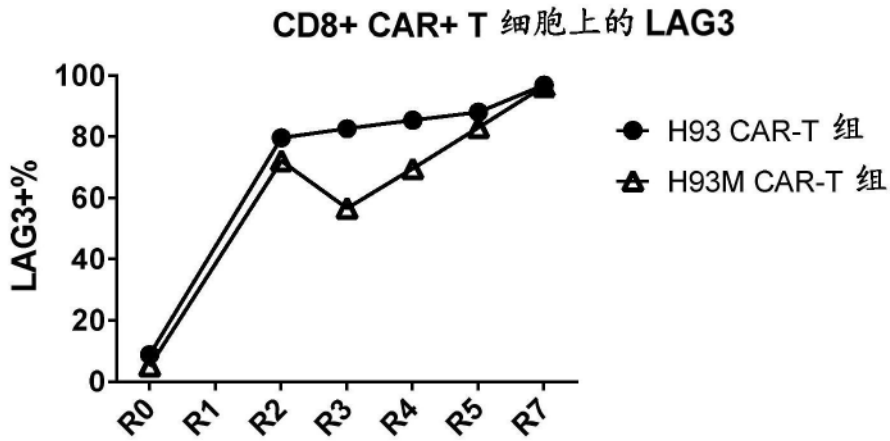


图18D

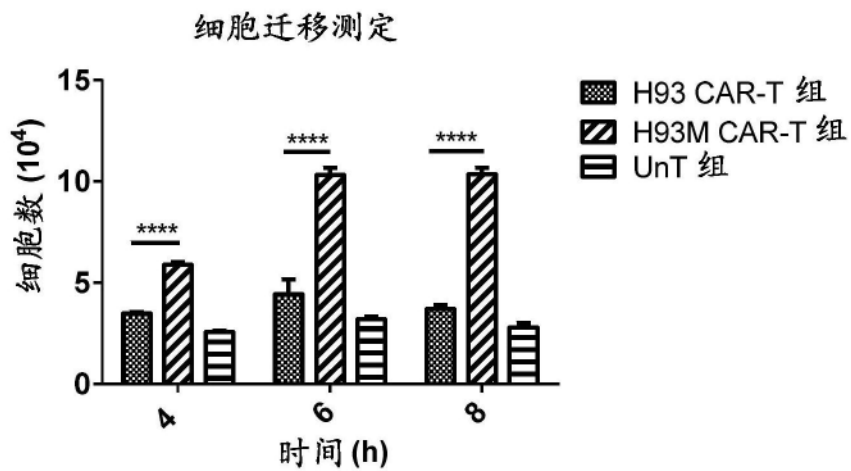


图19A

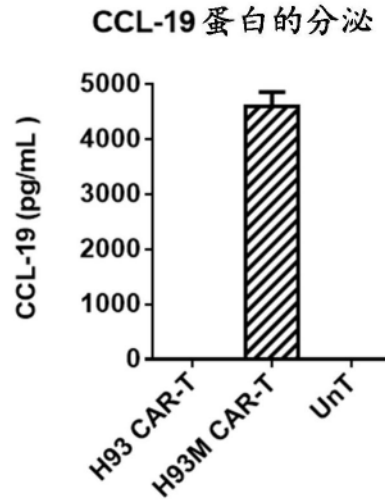


图19B

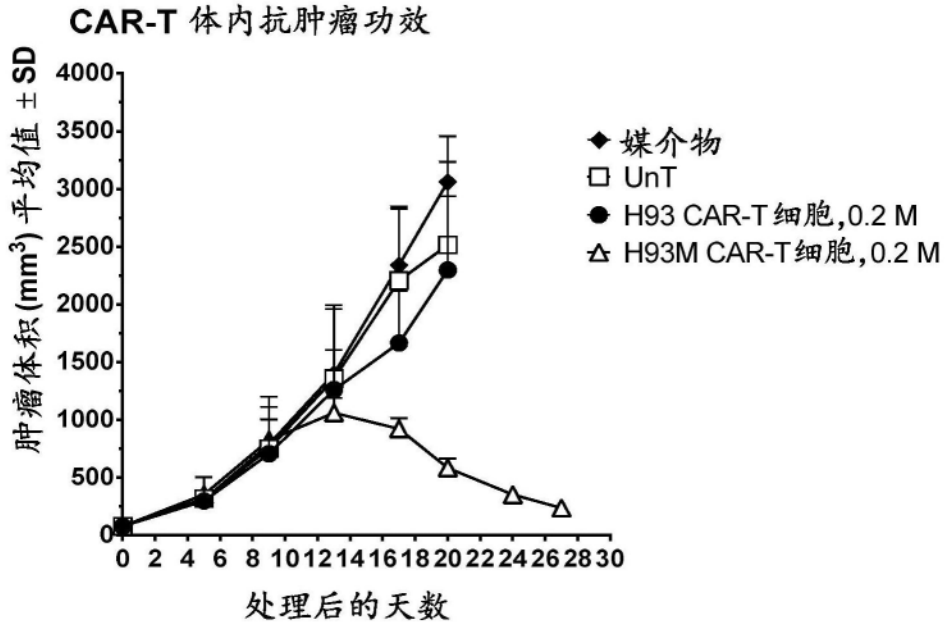


图20A

CAR-T 体内抗肿瘤功效

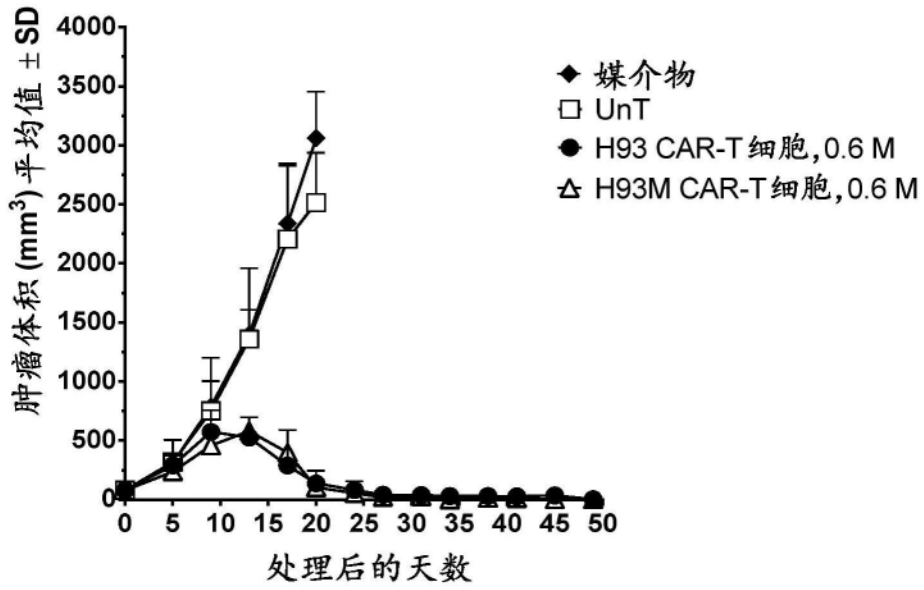


图20B

NCG小鼠外周血中的CAR拷贝数

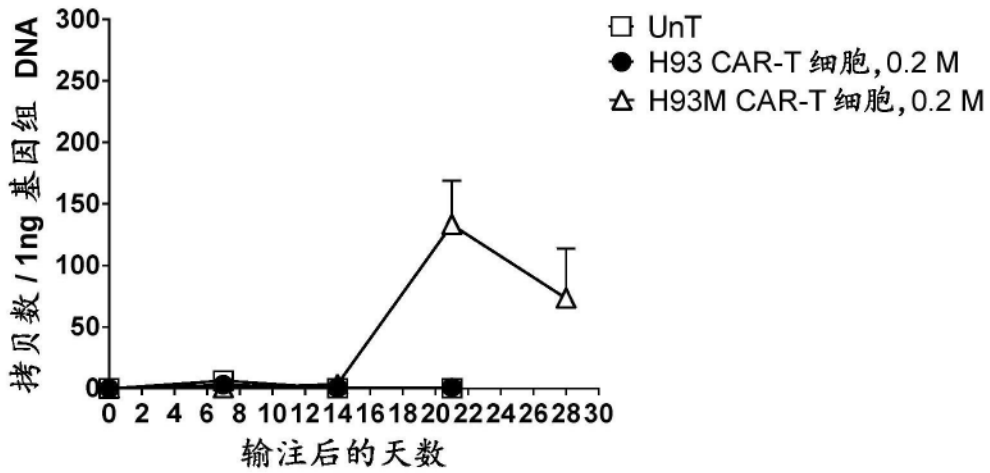


图20C

NCG小鼠外周血中的CAR拷贝数

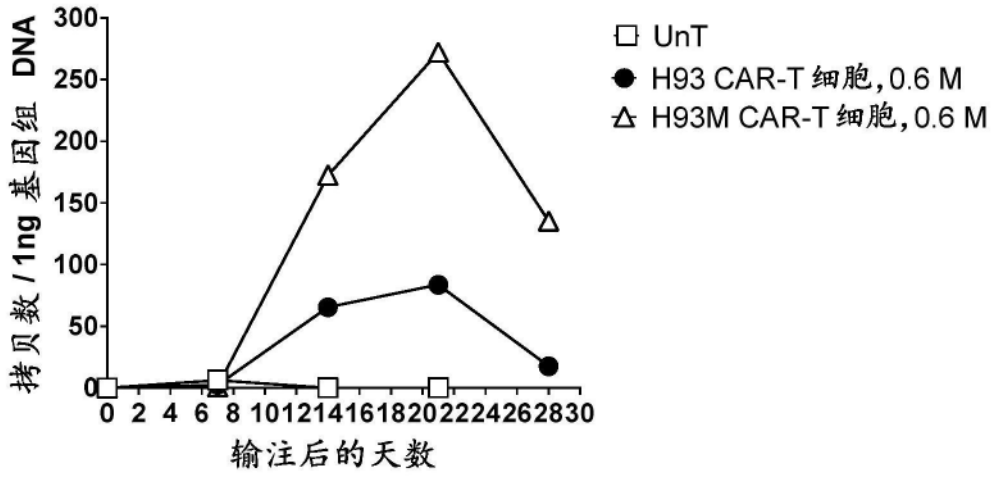


图20D

体重变化

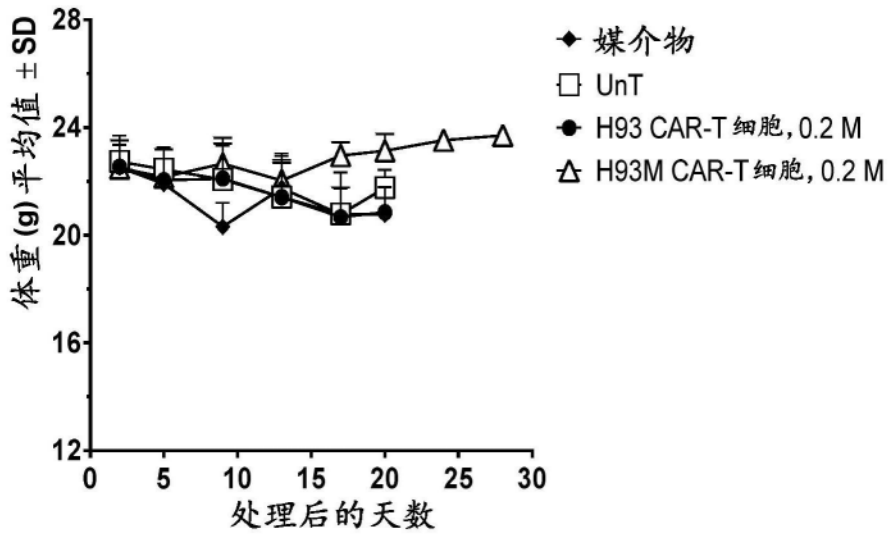


图21A

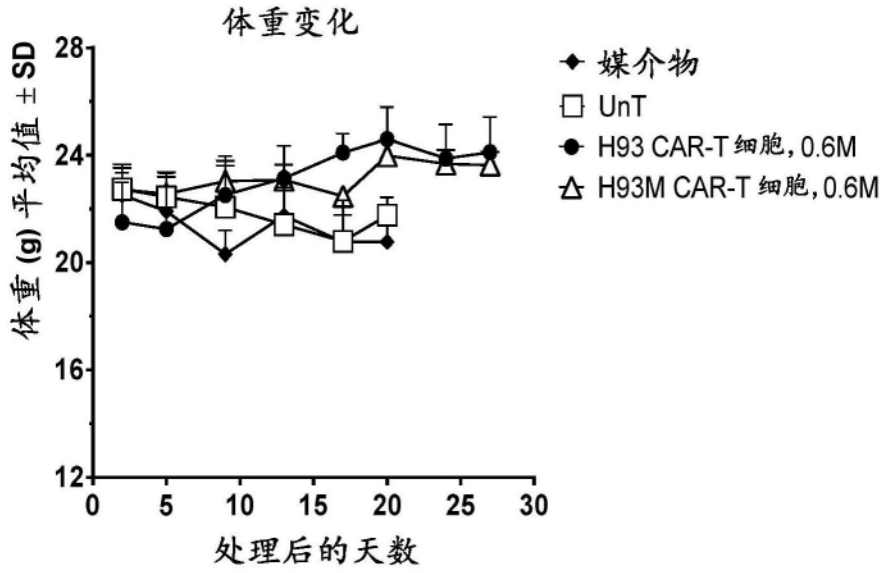


图21B

NCG小鼠外周血中的 IL-23 蛋白水平

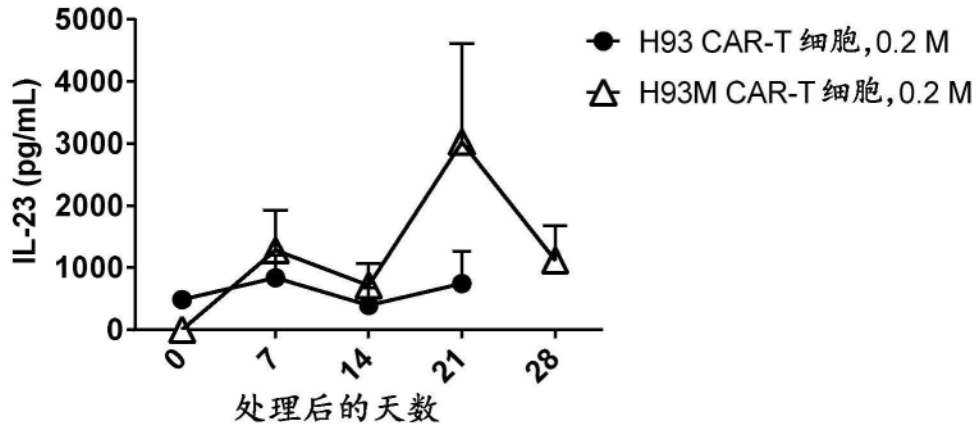


图22A

NCG小鼠外周血中的
IL-23 蛋白水平

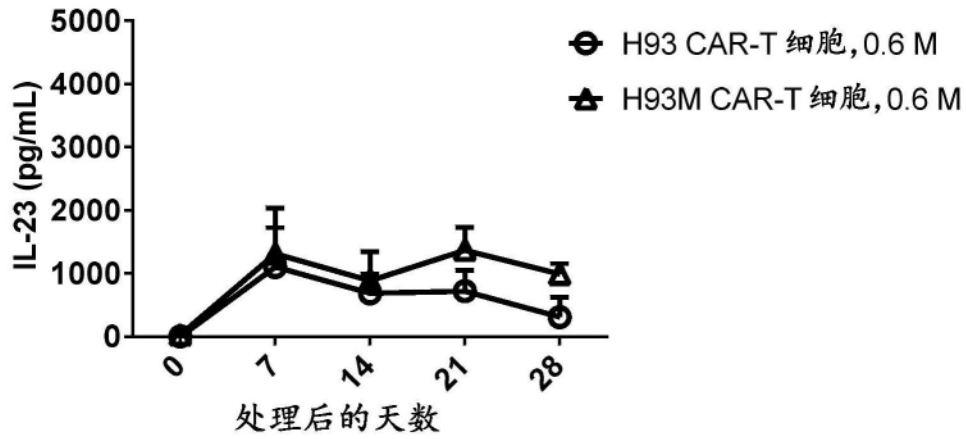


图22B

NCG小鼠外周血中的
IFN- γ 蛋白水平

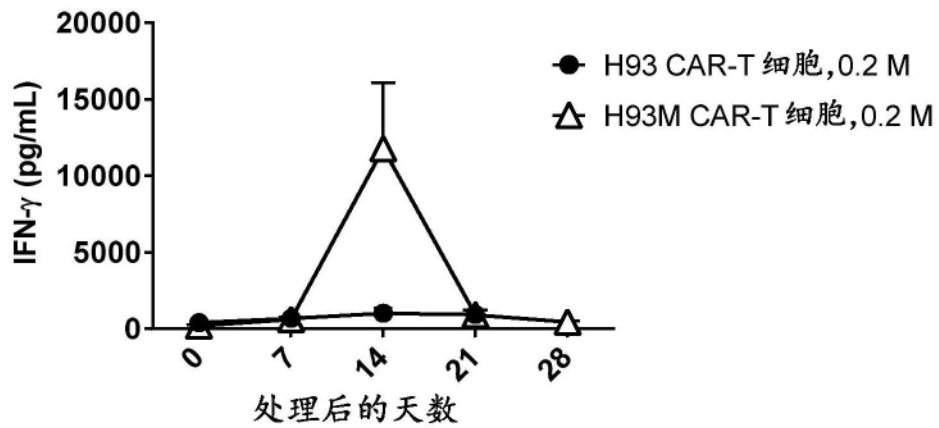


图22C

NCG小鼠外周血中的
IFN- γ 蛋白水平

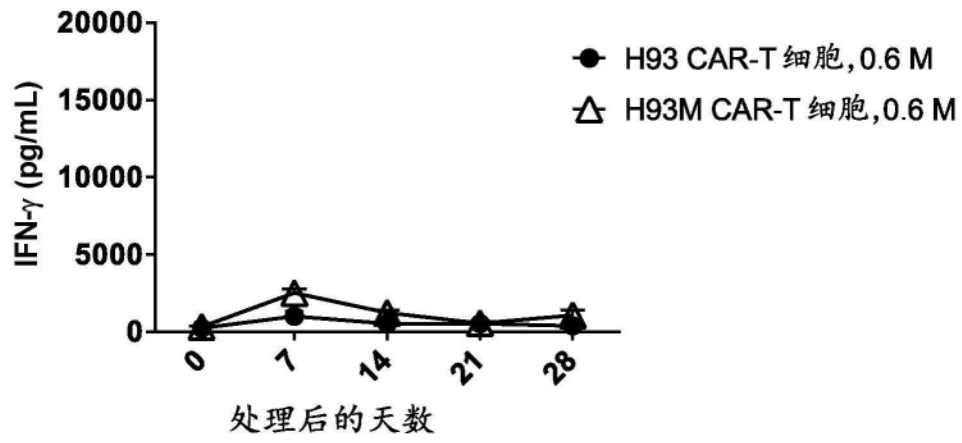


图22D

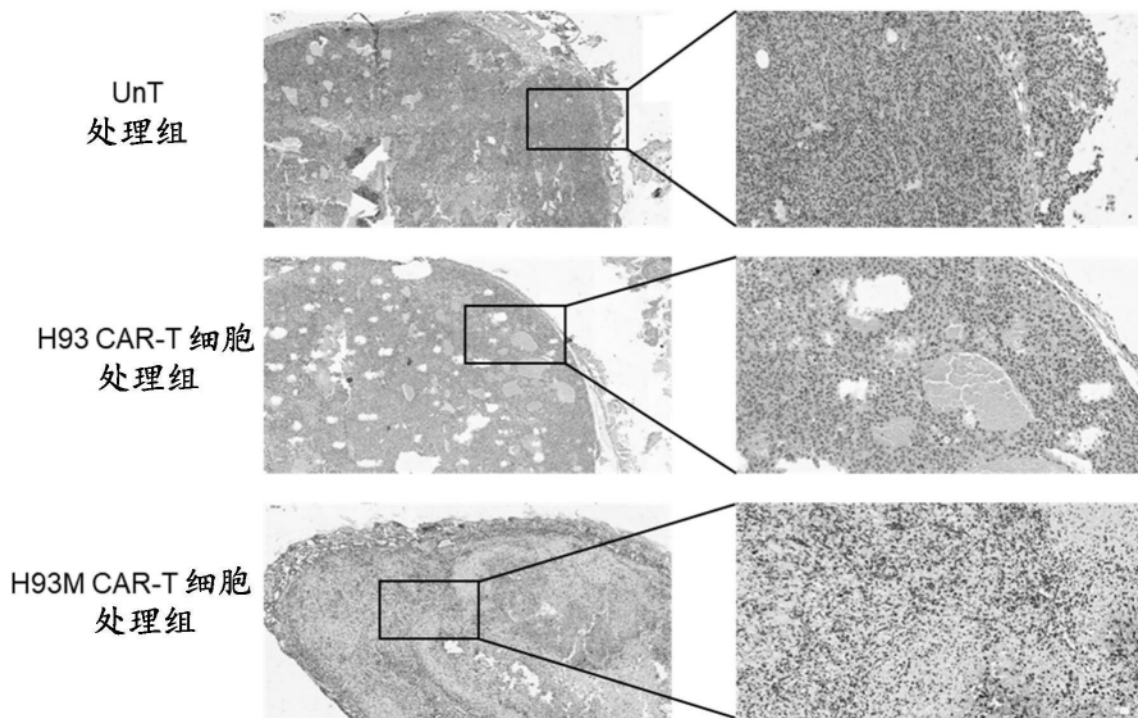


图23

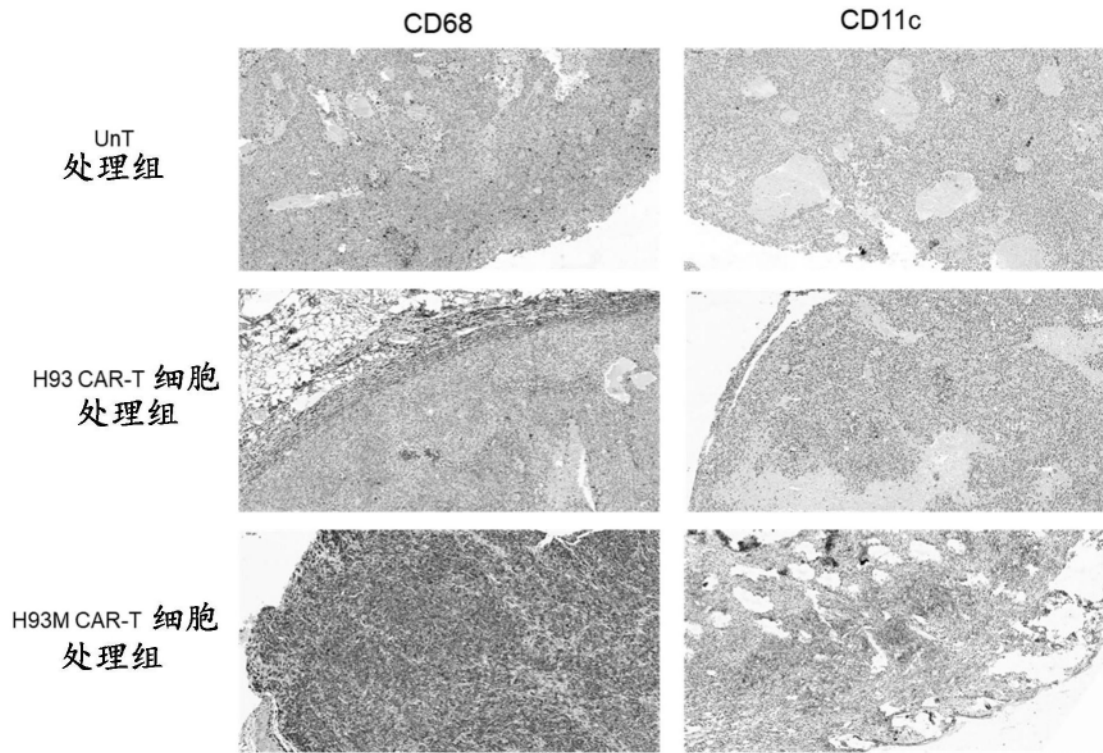


图24