



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110662560 B

(45) 授权公告日 2024.06.28

(21) 申请号 201880034376.0

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

(22) 申请日 2018.03.26

专利代理人 张莉 黄革生

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110662560 A

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.01.07

C07K 14/735 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/28 (2006.01)

17163090.8 2017.03.27 EP

C07K 16/30 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/00 (2006.01)

2019.11.25

A61K 35/17 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 14/725 (2006.01)

PCT/EP2018/057566 2018.03.26

C07K 14/705 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02018/177966 EN 2018.10.04

WO 2016040441 A1, 2016.03.17

(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司

Tilman Schlothauer等.Novel human IgG1

地址 瑞士巴塞尔

and IgG4 Fc-engineered antibodies with
completely abolished immune effector
functions.《Protein Engineering, Design &
Selection》.2016, 第29卷第457-466页.

(72) 发明人 K-G · 施图本拉赫 E · 默斯纳

审查员 魏应亮

C · 克莱因 D · 达洛夫斯基

权利要求书2页 说明书116页

序列表82页 附图33页

(54) 发明名称

改进的抗原结合受体

(57) 摘要

本发明涉及能够特异性结合具有降低的Fc受体结合的突变Fc结构域的抗原结合受体和表达这些抗原结合受体的T细胞。更准确地，本发明涉及由CD3胞内结构域偶联CD28胞内和跨膜结构域组成的工程化Fc受体。胞外部分优选由抗Pro329Gly抗体可变结构域组成。本发明涉及在癌症治疗和诊断中的应用。



scFv 形式

图 1 A

Fab 形式

图 1 B

1. 一种抗原结合受体，其中所述抗原结合受体包含：包含抗原结合部分的胞外结构域、锚定跨膜结构域以及至少一个刺激信号传导结构域和/或至少一个共刺激信号传导结构域，其中抗原结合部分能够特异性结合突变的片段可结晶(Fc)结构域，但不能特异性结合未突变的亲本Fc结构域，其中所述抗原结合部分是scFv或Fab。

其中所述未突变的亲本Fc结构域为人IgG1 Fc结构域，且其中所述突变的Fc结构域为仅在根据EU编号的L234、L235、和P329位置具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G的人IgG1 Fc结构域。

2. 权利要求1的抗原结合受体，其中锚定跨膜结构域是选自CD8、CD3z、FCGR3A、NKG2D、CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12跨膜结构域或其片段的跨膜结构域。

3. 权利要求2的抗原结合受体，其中锚定跨膜结构域是CD28跨膜结构域或其片段。

4. 权利要求1的抗原结合受体，其中至少一个刺激信号传导结构域独立地选自CD3z、FCGR3A或NKG2D的胞内结构域或其片段。

5. 权利要求4的抗原结合受体，其中至少一个刺激信号传导结构域是CD3z胞内结构域或其片段。

6. 权利要求1的抗原结合受体，其中至少一个共刺激信号传导结构独立地选自CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12的胞内结构域或其片段。

7. 权利要求6的抗原结合受体，其中至少一个共刺激信号结构域是CD28胞内结构域或其片段。

8. 权利要求1的抗原结合受体，其中抗原结合受体为包含一个含有CD28胞内结构域或其片段的刺激信号传导结构域、以及一个含有CD3z胞内结构域或其片段的共刺激信号传导结构域的嵌合抗原受体。

9. 权利要求1的抗原结合受体，其中抗原结合部分是scFv片段，其中scFv片段在C-末端连接锚定跨膜结构域的N-末端。

10. 权利要求9的抗原结合受体，其中scFv片段通过肽接头在C-末端连接锚定跨膜结构域的N-末端。

11. 权利要求1的抗原结合受体，其中抗原结合部分是Fab片段，其中Fab片段在重链的C-末端连接锚定跨膜结构域的N-末端。

12. 权利要求11的抗原结合受体，其中Fab片段通过肽接头在重链的C-末端连接锚定跨膜结构域的N-末端。

13. 权利要求1至12任一项的抗原结合受体，其中抗原结合部分包含：

(i) 重链可变区(VH)，其包含

(a) 重链互补决定区(CDR H)1氨基酸序列RYWMN(SEQ ID NO: 1)

(b) CDR H2氨基酸序列EITPDSSTINYTPSLKD(SEQ ID NO: 2)；和

(c) CDR H3氨基酸序列PYDYGAWFAS(SEQ ID NO: 3)；和

(ii) 轻链可变区(VL)，其包含

(d) 轻链互补决定区(CDR L)1氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO: 4)；

(e) CDR L2氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO: 5)；和

(f) CDR L3氨基酸序列ALWYSNHWW(SEQ ID NO: 6)。

14. 一种能够表达权利要求1至13任一项的抗原结合受体的转导T细胞。

15. 一种编码权利要求1至13任一项的抗原结合受体的分离多核苷酸。
16. 一种载体,其包含权利要求15的多核苷酸。
17. 权利要求16的载体,其中所述载体是表达载体。
18. 一种包含权利要求15的编码抗原结合受体的多核苷酸的转导T细胞。
19. 一种药盒,其包含
 - (A)能够表达权利要求1至13任一项的抗原结合受体的转导T细胞;和
 - (B)包含突变Fc结构域的抗体,其中所述突变Fc结构域为仅在根据EU编号的L234、L235、和P329位置具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G的人IgG1 Fc结构域。
20. 一种药盒,其包含
 - (A)编码权利要求1至13任一项的抗原结合受体的分离多核苷酸;和
 - (B)包含突变Fc结构域的抗体,其中所述突变Fc结构域为仅在根据EU编号的L234、L235、和P329位置具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G的人IgG1 Fc结构域。
21. 权利要求19或20的药盒,其中包含所述突变Fc结构域的所述抗体能够与肿瘤细胞表面上表达的抗原特异性结合。
22. 权利要求19至20任一项的药盒,其中包含突变Fc结构域的抗体能够特异性结合选自成纤维细胞激活蛋白(FAP)、癌胚抗原(CEA)、间皮素(MSLN)、CD20、叶酸受体1(FOLR1)和肌腱蛋白(TNC)的抗原。
23. 权利要求19至22任一项的药盒在制备药物中的用途。
24. 权利要求19至22任一项的药盒在制备用于疾病的治疗的药物中的用途。
25. 权利要求24的用途,其中所述用途是在制备用于恶性疾病的治疗的药物中的用途。
26. 权利要求1至13任一项的抗原结合受体或权利要求14的转导T细胞在制备药物中的用途,其中所述药物被配制为与包含突变Fc结构域的抗体组合施用,其中所述突变Fc结构域为仅在根据EU编号的L234、L235、和P329位置具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G的人IgG1 Fc结构域,并且其中权利要求1-13任一项的表达所述抗原结合受体的转导T细胞或权利要求14的转导T细胞在施用所述包含突变Fc结构域的抗体之前、同时或之后施用。
27. 权利要求26的用途,其中所述包含突变Fc结构域的抗体能够与肿瘤细胞表面上表达的抗原特异性结合,且其中所述药物用于恶性疾病的治疗。

改进的抗原结合受体

发明领域

[0001] 本发明总体涉及能够特异性结合具有降低的Fc受体结合的突变Fc结构域的抗原结合受体和表达这些抗原结合受体的T细胞。更准确地，本发明涉及用抗原结合受体转染/转导的T细胞，其通过特异地结合治疗性抗体的突变Fc结构域/与治疗性抗体的突变Fc结构域特异地相互作用而被募集。此外，本发明涉及包含本发明的T细胞和/或表达本发明的抗原结合受体的核酸分子、载体、和一种/多种包含突变Fc结构域的肿瘤靶向抗体的试剂盒。本发明还提供T细胞的生产、以及T细胞联合肿瘤特异性抗体在特定疾病治疗方法中的用途，以及包含T细胞和/或治疗性抗体的药物组合物/药物，其中T细胞联合一种/多种包含具有降低的Fc受体结合的突变Fc结构域的治疗性肿瘤靶向抗体来施用。

背景技术

[0002] 过继性T细胞疗法 (ACT) 是使用癌症特异性T细胞的有效治疗方法 (Rosenberg和Restifo, Science 348 (6230) (2015), 62-68)。ACT可以使用天然存在的肿瘤特异性细胞或使用嵌合抗原受体通过基因工程赋予特异性的T细胞 (Rosenberg和Restifo, Science 348 (6230) (2015), 62-68)。ACT在患有晚期和其他难治性疾病 (如急性淋巴性白血病、非霍奇金淋巴瘤或黑素瘤) 的患者中可以成功治疗和诱导缓解 (Dudley等, JClinOncol 26 (32) (2008), 5233-5239; Grupp等, NEnglJMed 368 (16) (2013), 1509-1518; Kochenderfer等, JClinOncol. (2015) 33 (6) : 540-549, doi:10.1200/JCO.2014.56.2025. Epub 2014年8月25日)。

[0003] 然而，尽管临床功效令人印象深刻，但ACT受到治疗相关毒性的限制。ACT中使用的工程化T细胞的特异性以及由此产生的中靶 (on-target) 和脱靶 (off-target) 效应主要由嵌合抗原受体 (CAR) 中的肿瘤靶向抗原结合部分驱动。肿瘤抗原的非排他性表达或表达水平的时间差异可能导致由治疗的不可忍受的毒性而引起的严重副作用，或甚至ACT失败。

[0004] 另外，用于有效的肿瘤细胞裂解的肿瘤特异性T细胞的可用性取决于工程化T细胞在体内的长期存活和增殖能力。而另一方面，由于不受控制的CAR-T应答的持续存在，T细胞的体内存活和增殖可能导致不良的长期影响 (Grupp等, 2013 NEnglJMed 368 (16) : 1509-18, Maude等, 2014 NEnglJMed 371 (16) : 1507-17)。

[0005] 一种用于限制ACT的严重治疗相关毒性和提高安全性的方法是，通过在免疫突触中引入适体 (adaptor) 分子来限制CAR-T细胞的激活和增殖。这样的适体分子包含小分子双模块开关，例如，最近描述的叶酸-FITC开关 (Kim等, J Am Chem Soc 2015; 137: 2832-2835)。再一种方法包括人工修饰的抗体，其包含标签来指导和指引CAR-T细胞的特异性靶向肿瘤细胞 (Ma等, PNAS 2016; 113 (4) : E450-458, Cao等, Angew Chem 2016; 128: 1-6, Rogers等, PNAS 2016; 113 (4) : E459-468, Tamada等, Clin Cancer Res 2012; 18 (23) : 6436-6445)。

[0006] 然而，现有的方法具有几个限制。依赖于分子开关的免疫突触需要引入另外的元件，其可能引发免疫应答或导致非特异性脱靶效应。此外，这样的多组分系统的复杂性可能

限制治疗功效和耐受性。另一方面,现有治疗性单克隆抗体中标签结构的引入可能影响这些构建体的功效和安全性特征。

[0007] 因此,为了满足癌症患者的需求,需要改进靶向肿瘤疗法,特别是过继性T细胞疗法。因此,仍然需要提供改进的手段,所述手段具有提高ACT的安全性和功效以及克服上述缺陷的潜力。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明总地涉及能够特异性结合具有降低的Fc受体结合的突变Fc结构域的抗原结合受体和表达这些抗原结合受体的T细胞。

[0010] 在一个方面中,本发明涉及包含锚定跨膜结构域和包含抗原结合部分的胞外结构域的抗原结合受体,其中抗原结合部分能够特异性结合突变的片段可结晶(Fc)结构域,但不能特异性结合未突变的亲本Fc结构域,其中突变Fc结构域与未突变亲本Fc结构域相比,包含至少一个氨基酸置换。

[0011] 在一个实施方案中,与未突变亲本Fc结构域的Fc受体结合相比,突变Fc结构域的Fc受体结合降低,特别是其中Fc受体是Fc γ 受体或新生儿Fc受体(FcRn)。在一个实施方案中,在25°C通过表面等离子体共振(SPR)来测量Fc受体结合。

[0012] 在一个实施方案中,抗原结合部分是scFv、Fab、交叉Fab(crossFab)或scFab。在优选实施方案中,抗原结合部分是scFv。在另一个优选实施方案中,抗原结合部分是Fab或交叉Fab。

[0013] 在一个实施方案中,锚定跨膜结构域是选自CD8、CD3z、FCGR3A、NKG2D、CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12跨膜结构域或其片段的跨膜结构域。

[0014] 在一个实施方案中,锚定跨膜结构域是CD28跨膜结构域,特别是其中锚定跨膜结构域包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0015] 在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含至少一个刺激信号传导结构域和/或至少一个共刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,所述至少一个刺激信号传导结构域分别独立地选自CD3z的、FCGR3A的和NKG2D的胞内结构域,或其片段。在一个实施方案中,所述至少一个刺激信号传导结构域是CD3z的胞内结构域的片段,特别是其中所述至少一个刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述至少一个共刺激信号传导结构域分别独立地选自CD27的、CD28的、CD137的、OX40的、ICOS的、DAP10的和DAP12的胞内结构域,或其片段。在一个实施方案中,至少一个共刺激信号传导结构域是CD28胞内结构域的片段。在一个实施方案中,抗原结合受体包含一个刺激信号传导结构域,其包含CD3z的胞内结构域或其片段;且其中抗原结合受体包含一个共刺激信号传导结构域,其包含CD28的胞内结构域或其片段。在一个实施方案中,刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列和共刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0016] 在一个实施方案中,胞外结构域连接锚定跨膜结构域,任选通过肽接头连接。在一个实施方案中,肽接头包含氨基酸序列GGGGS(SEQ ID NO:17)。在一个实施方案中,锚定跨膜结构域连接共信号传导结构域或信号传导结构域,任选通过肽接头。在一个实施方案中,信号传导和/或共信号传导结构域连接,任选通过至少一个肽接头。

[0017] 在一个实施方案中,抗原结合部分是scFv片段,其中scFv片段在C-末端连接到锚定跨膜结构域的N-末端,任选通过肽接头。

[0018] 在一个实施方案中,抗原结合部分是Fab片段或交叉Fab片段,其中Fab或交叉Fab片段在重链的C-末端连接到锚定跨膜结构域的N-末端,任选通过肽接头。

[0019] 在一个实施方案中,抗原结合受体包含一个共信号传导结构域,其中共信号传导结构域在N-末端连接锚定跨膜结构域的C-末端。在一个实施方案中,抗原结合受体包含一个刺激信号传导结构域,其中刺激信号传导结构域在N-末端连接共刺激信号传导结构域的C-末端。

[0020] 在一个实施方案中,未突变的亲本Fc结构域是IgG1或IgG4 Fc结构域,特别是人IgG1Fc结构域。在一个实施方案中,突变Fc结构域在选自根据EU编号的L234、L235、I253、H310、P331、P329和H435的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是其中氨基酸突变是L234A、L235A、I253A、N297A、H310A、P329G和/或H435A。

[0021] 在一个实施方案中,突变Fc结构域在选自根据EU编号的L234、L235和P329的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是氨基酸突变L234A、L235A和P329G (“PGLALA”)。

[0022] 在一个实施方案中,突变Fc结构域包含根据EU编号的氨基酸突变P329G,其中与未突变亲本Fc结构域的Fc γ 受体结合相比,突变Fc结构域的Fc γ 受体结合降低,特别是其中Fc γ 受体是人Fc γ RIIIa和/或Fc γ RIIa。

[0023] 在一个实施方案中,突变Fc结构域在选自根据EU编号的I253、H310和H435的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是氨基酸突变I253A、H310A和H435A (“AAA”),其中与未突变亲本Fc结构域的FcRn结合相比,突变Fc结构域的FcRn结合降低。

[0024] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域,但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域,其中抗原结合部分包含:

[0025] (i) 重链可变区 (VH),其包含

[0026] (a) 重链互补决定区 (CDR H) 1氨基酸序列RYWMN (SEQ ID NO:1)

[0027] (b) CDR H2氨基酸序列EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO:2); 和

[0028] (c) CDR H3氨基酸序列PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3); 和

[0029] (ii) 轻链可变区 (VL),其包含

[0030] (d) 轻链互补决定区 (CDR L) 1氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4);

[0031] (e) CDR L2氨基酸序列GTNKRAP (SEQ ID NO:5); 和

[0032] (f) CDR L3氨基酸序列ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6)。

[0033] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域,但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域,其中抗原结合部分包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),重链可变区包含与选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:32的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:33的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0034] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分包含SEQ ID NO:8的重链可变区 (VH) 和SEQ ID NO:9的轻链可变区 (VL)。

[0035] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv,其中抗原结合受体包含与选自SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:31的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或

100%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗原结合受体包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0036] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含

[0037] a)与选自SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:48的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的重链融合多肽;和

[0038] b)与选自SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:50的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的轻链多肽。

[0039] 在一个实施方案中,抗原结合受体包含

[0040] a)SEQ ID NO:39的重链融合多肽;和

[0041] b)SEQ ID NO:41的轻链多肽。

[0042] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A(“AAA”)突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域,其中抗原结合部分包含:

[0043] (i)重链可变区(VH),其包含

[0044] (a)重链互补决定区(CDR H)1氨基酸序列SYGMS(SEQ ID NO:53)

[0045] (b)CDR H2氨基酸序列SSGGGSY(SEQ ID NO:54);和

[0046] (c)CDR H3氨基酸序列LGMITTGYAMDY(SEQ ID NO:55);和

[0047] (ii)轻链可变区(VL),其包含

[0048] (d)轻链互补决定区(CDR L)1氨基酸序列RSSQTIVHSTGHTYLE(SEQ ID NO:56);

[0049] (e)CDR L2氨基酸序列KVSNRFS(SEQ ID NO:57);和

[0050] (f)CDR L3氨基酸序列FQGSHVPYT(SEQ ID NO:58)。

[0051] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A(“AAA”)突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域,其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区包含与SEQ ID NO:61的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链可变区包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0052] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分包含

[0053] a)SEQ ID NO:61的重链可变区(VH);和

[0054] b)SEQ ID NO:62的轻链可变区(VL)。

[0055] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A(“AAA”)突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv,其中抗原结合受体包含与SEQ ID NO:59的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗原结合受体包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0056] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含

[0057] a)与SEQ ID NO:39的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的重链融合多肽;和

[0058] b) 与SEQ ID NO:41的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的轻链多肽。

[0059] 在一个实施方案中,抗原结合受体包含

[0060] a) SEQ ID NO:39的重链融合多肽;和

[0061] b) SEQ ID NO:41的轻链多肽。

[0062] 在一个实施方案中,提供了编码本文所述的抗原结合受体的分离多核苷酸。在一个实施方案中,提供了编码本文所述的抗原结合受体的重链融合多肽或轻链多肽的分离多核苷酸。在一个实施方案中,提供了编码本文所述的抗原结合受体的组合物,其包含编码重链融合多肽的第一分离多核苷酸,和编码轻链多肽的第二分离多核苷酸。

[0063] 在一个实施方案中,提供了由本文所述的多核苷酸或本文所述的组合物编码的多肽。

[0064] 在一个实施方案中,提供了包含本文所述的多核苷酸的载体,特别是表达载体。

[0065] 在一个实施方案中,提供了包含本文所述的多核苷酸或本文所述的载体的转导T细胞。在一个实施方案中,提供了能够表达本文所述的抗原结合受体的转导T细胞。在一个实施方案中,提供了本文所述的转导T细胞,其中转导的T细胞用能够特异性结合靶抗原的T细胞受体(TCR)共同转导。

[0066] 在一个实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含

[0067] (A) 能够表达本文所述的抗原结合受体的转导T细胞;和

[0068] (B) 包含突变Fc结构域的抗体;

[0069] 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0070] 在一个实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含

[0071] (A) 编码本文所述的抗原结合受体的分离多核苷酸;和

[0072] (B) 包含突变Fc结构域的抗体;

[0073] 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0074] 在一个实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含

[0075] (A) 本文所述的编码本文所述的抗原结合受体的组合物或载体;和

[0076] (B) 包含突变Fc结构域的抗体;

[0077] 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0078] 在一个实施方案中,未突变亲本Fc结构域是IgG1或IgG4 Fc结构域,特别是人IgG1 Fc结构域。在一个实施方案中,提供了突变Fc结构域,其在选自根据EU编号的L234、L235、I253、H310、P331、P329和H435的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是其中氨基酸突变是L234A、L235A、I253A、N297A、H310A、P329G和/或H435A。在一个实施方案中,突变Fc结构域在选自根据EU编号的L234、L235和P329的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是氨基酸突变L234A、L235A和P329G (“PGLALA”)。在一个实施方案中,突变Fc结构域包含根据EU编号的氨基酸突变P329G。在一个实施方案中,突变Fc结构域在选自根据EU编号的I253、H310和H435的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是氨基酸突变I253A、H310A和H435A (“AAA”)。

[0079] 在一个实施方案中,包含突变Fc结构域的抗体能够特异性结合肿瘤细胞表面上的抗原,特别是其中抗原选自FAP、CEA、p95、BCMA、EpCAM、MSLN、MCSP、HER-1、HER-2、HER-3、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52F1t3、FOLR1、Trop-2、CA-12-5、HLA-DR、MUC-1(粘蛋白)、A33-抗原、PSMA、PSCA、转铁蛋白受体、TNC(肌腱蛋白)和CA-IX,和/或结合人主要组织相容性复合物(MHC)分子的肽。在一个实施方案中,包含突变Fc结构域的抗体能够特异性结合选自成纤维细胞激活蛋白(FAP)、癌胚抗原(CEA)、间皮素(MSLN)、CD20、叶酸受体1(FOLR1)和肌腱蛋白(TNC)的抗原。

[0080] 在一个实施方案中,提供了本文所述的试剂盒用作药物。

[0081] 在一个实施方案中,提供了本文所述的抗原结合受体或转导T细胞用作药物,其中在包含突变Fc结构域的抗体施用之前、同时或之后施用表达抗原结合受体的转导T细胞,其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域,但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0082] 在一个实施方案中,提供了本文所述的试剂盒用于恶性的治疗中。在一个实施方案中,提供了本文所述的抗原结合受体或转导T细胞用于恶性的治疗中,其中治疗包括在包含突变Fc结构域的抗体施用之前、同时或之后施用表达抗原结合受体的转导T细胞,其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域,但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0083] 在一个实施方案中,所述恶性的疾病选自上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0084] 在一个实施方案中,转导T细胞源自从待治疗受试者分离的细胞。在一个实施方案中,转导T细胞不是源自从待治疗受试者分离的细胞。

[0085] 在一个实施方案中,提供了治疗受试者疾病的方法,包括将本文所述的能够表达抗原结合受体的转导T细胞施用于受试者并在转导T细胞施用之前、同时或之后施用治疗有效量的包含突变Fc结构域的抗体,其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。在一个实施方案中,另外从受试者分离T细胞并且用本文所述的多核苷酸、组合物或载体转导分离的T细胞来产生转导T细胞。在一个实施方案中,用逆转录病毒或慢病毒载体构建体或用非病毒载体构建体转导T细胞。在一个实施方案中,非病毒载体构建体是睡美人迷你环载体(Sleeping Beauty Minicircle vector)。

[0086] 在一个实施方案中,通过静脉内输注将转导T细胞施用于受试者。在一个实施方案中,在施用于受试者之前,将转导T细胞接触抗CD3和/或抗CD28抗体。在一个实施方案中,在施用于受试者之前,将转导T细胞接触至少一种细胞因子,优选接触白介素-2(IL-2)、白介素-7(IL-7)、白介素-15(IL-15)和/或白介素-21,或其变体。

[0087] 在一个实施方案中,疾病是恶性的。在一个实施方案中,恶性的疾病选自上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0088] 在一个实施方案中,提供了一种用于诱导靶细胞裂解的方法,包括在包含突变Fc结构域的抗体的存在下,将靶细胞接触能够表达本文所述的抗原结合受体的转导T细胞,其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域,但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0089] 在一个实施方案中,靶细胞是癌细胞。在一个实施方案中,靶细胞表达选自FAP、CEA、p95、BCMA、EpCAM、MSLN、MCSP、HER-1、HER-2、HER-3、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52F1t3、FOLR1、Trop-2、CA-12-5、HLA-DR、MUC-1(粘蛋白)、A33-抗原、PSMA、PSCA、转铁蛋白受体、TNC(肌腱蛋白)和CA-IX的抗原。在一个实施方案中,靶细胞表达选自癌胚抗原

(CEA)、间皮素 (MSLN)、CD20、叶酸受体1 (FOLR1) 和肌腱蛋白 (TNC) 的抗原。

[0090] 在一个实施方案中,将本文所述的多核苷酸或转导T细胞用于药物的制造。在一个实施方案中,药物用于恶性的疾病的治疗。

[0091] 附图简述

[0092] 图1描绘了根据本发明的示例性抗原结合受体的结构。图1A显示了抗-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD格式和抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD格式的结构。描绘了包含能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域。抗原结合部分由可变重链和可变轻链组成。两者通过(Gly₄Ser)₄接头连接。连接可变轻链的Gly₄Ser接头将抗原识别结构域与CD28跨膜结构域(TM)连接起来,该CD28跨膜结构域(TM)与CD28的胞内共刺激信号结构域(CSD)融合,而CD28的共刺激信号结构域(CSD)与CD3z的刺激信号结构域(SSD)融合。图1B显示了抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD和抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD格式的结构。描绘了包含能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域。抗原结合部分由Ig重链和Ig轻链组成。连接重链的Gly₄Ser接头将抗原识别结构域与CD28跨膜结构域融合,该CD28跨膜结构域与CD28的胞内共刺激信号结构域融合,而CD28的胞内共刺激信号结构域与CD3z的刺激信号结构域融合。

[0093] 图2的示意图描绘了编码本发明抗原结合受体的示例性表达构建体的模块组成。图2A描述了P392G靶向scFv格式。图2B描述了P392G靶向Fab格式。

[0094] 图3描绘了在Fc结构域中带有P329G突变的示例性IgG1分子,其被本发明的抗P329G抗原结合受体识别。

[0095] 图4描绘了肿瘤相关抗原(TAA)与带有P329G突变的IgG结合的示意图。该抗体又可以被表达抗P329G抗原结合受体的T细胞识别,从而激活T细胞。

[0096] 图5显示了Jurkat NFAT T细胞报告分子测定的示意图。结合带有P329G突变的IgG的TAA可以被表达抗P329G抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞识别。这种识别导致细胞的激活,这可以通过测量发光(cps)来检测。

[0097] 图6描绘了使用表达CD20的SUDHL4肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用了带有P329G突变的抗CD20 IgG抗体(GA101),其一方面识别肿瘤相关抗原,而另一方面被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞识别。在图6A中,将表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。在图6B中,使用表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。

[0098] 图7描绘了使用CD20肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用带有P329G突变的抗-CD20 IgG抗体(GA101),其识别肿瘤相关抗原,并且被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞识别。在图7A中,将表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的单克隆5用作效应细胞,而将WSUDLCL2细胞用作肿瘤细胞。在图7B中,将表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的单克隆2用作效应细胞,而将WSUDLCL2细胞用作肿瘤细胞。在图7C中,将表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的单克隆5用作效应细胞,而将SUDHL4细胞用作肿瘤细胞。在图7D中,将表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-

CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的单克隆2用作效应细胞,而将SUDHL4用作肿瘤细胞。

[0099] 图8描述了使用表达粘附性FAP的NIH/3T3-huFAP c1 19肿瘤细胞作为靶细胞进行的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用带有P329G突变的抗FAP IgG抗体克隆4B9,其识别肿瘤相关抗原,并且被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞识别。包括带有P329G突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。在图8A中,使用表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的分选池作为效应细胞。在图8B中,将表达抗P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。在图8C中,将表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。在图8D中,将表达抗P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。

[0100] 图9描绘了使用表达粘附性CEA的MKN45肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用带有P329G突变的抗CEA IgG克隆A5B7或抗CEA IgG克隆T84 LCHA,它们均识别肿瘤相关抗原,并被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞识别。进一步包括带有P329G突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。在图9A和图9B中,将表达抗P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。在图9C和图9D中,将表达抗P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。

[0101] 图10描绘了使用表达粘附性CEA的MKN45肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用带有P329G突变的抗CEA克隆CH1A1A 98 99或抗CEA IgG克隆hMN14 IgG,它们均识别肿瘤相关抗原,并被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞识别。进一步包括带P329G突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。在图10A和图10B中,将表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。在图10C和图10D中,将表达抗P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的NFATT细胞的分选池用作效应细胞。

[0102] 图11描绘了使用表达粘附性TNC的CT26TNC c1 19肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。将带有P329G突变的抗-TNC IgG克隆A2B10用作IgG抗体,其识别肿瘤相关抗原,并被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞识别。进一步包括带有P329G突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。在图11A和图11B中,将表达抗P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。在图11C和图11D中,将表达抗P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的NFAT T细胞的分选池用作效应细胞。

[0103] 图12A和图12B描绘了使用表达粘附性TNC的CT26TNC c1 19肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用具有P329G突变的抗TNC IgG克隆A2B10,其识别肿瘤相关抗原,并被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞识别。进一步包括带有P329G突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。将表达抗P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的分选库用作效应细胞。

[0104] 图13描绘了使用CD20肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用带有P329G和LALA突变,P329G和D265A突变,单独的LALA突变或根本没有突变的抗CD20

IgG抗体(GA101),以检测肿瘤相关抗原、以及抗体被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞的识别。在图13A中,将表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的细胞池用作效应细胞,而将SUDHL4细胞用作肿瘤细胞。在图13B中,将表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的细胞池用作效应细胞,而将SUDHL4细胞用作肿瘤细胞。

[0105] 图14描绘了使用CD20肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用带有P329G和LALA突变,单独的P329G突变,单独的LALA突变或根本没有突变的抗CD20IgG抗体(GA101),以检测肿瘤相关抗原、以及被表达根据本发明的抗原结合受体的Jurkat NFAT T细胞的识别。在图14A中,将表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的细胞池用作效应细胞,而将SUDHL4细胞用作肿瘤细胞。在图14B中,将表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的细胞池用作效应细胞,而将SUDHL4细胞用作肿瘤细胞。

[0106] 发明详述

[0107] 定义

[0108] 除非在下文中另外定义,否则术语按照本领域中常用的方式用于本文中。

[0109] “激活性Fc受体”是Fc受体,其在与抗体的Fc结构域结合后引发信号传导事件,刺激携带受体的细胞执行效应子功能。人激活性Fc受体包括Fc γ RIIIa(CD16a)、Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(CD32)和Fc α RI(CD89)。

[0110] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(“ADCC”)是导致免疫效应细胞裂解抗体包被的靶细胞的免疫机制。靶细胞是包含Fc区的抗体或其衍生物特异性结合的细胞,通常通过Fc区的N末端的蛋白质部分结合。如本文所用,术语“降低的ADCC”定义为,通过以上定义的ADCC机制,在靶细胞周围介质中给定的抗体浓度下,在给定时间内裂解的靶细胞数量的减少,和/或通过ADCC的机制,在给定时间内实现给定数目的靶细胞裂解所需的、在靶细胞周围介质中抗体浓度的增加。ADCC的降低是相对于由未突变的相同抗体介导的ADCC而言的,其中所述未突变的相同抗体使用相同的标准生产、纯化、配制和储存方法(其是本领域技术人员已知)、由相同类型的宿主细胞产生。例如,由在Fc结构域中包含降低ADCC的氨基酸突变的抗体介导的ADCC降低,是相对于在Fc结构域中没有该氨基酸突变的相同抗体介导的ADCC而言的。用于测量ADCC的合适测定法是本领域公知的(参见,例如,PCT公开号WO 2006/082515或PCT公开号WO2012/130831)。

[0111] “有效量”的药剂(例如,抗体)是指在其施用的细胞或组织中导致生理变化所需的量。

[0112] “亲和力”是指分子(例如,受体)的单个结合位点与其结合伴侣(例如,配体)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映结合对的成员(例如,抗原结合部分和抗原和/或受体及其配体)之间的1:1相互作用。分子X对其伴侣Y的亲和力通常可由解离常数(K_d)来表示,解离常数(K_d)是解离和缔合速率常数(分别为 k_{off} 和 k_{on})的比。因此,等效亲和力可以包括不同的速率常数,只要速率常数的比值保持相同即可。亲和力可以通过本领域熟知的方法来测量,包括本文所述的那些。测量亲和力的优选方法是表面等离子体共振(SPR),且优选的测量温度是25℃。

[0113] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似

的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的 α 碳,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。此类类似物具有修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化合物。氨基酸在本文中可以通过它们通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号表示。

[0114] 如本文所用的术语“氨基酸突变”表示包括氨基酸取代、缺失、插入和修饰。可以使取代、缺失、插入和修饰的任意组合达到最终构建体,条件是最终构建体具有所需特征,例如,减少的Fc受体结合。氨基酸序列缺失和插入包括氨基酸的氨基和/或羧基末端缺失和插入。特定的氨基酸突变是氨基酸取代。为了改变例如Fc区结合特征的目的,特别优选非保守氨基酸取代,即用具有不同结构和/或化学性质的另一种氨基酸取代一种氨基酸。氨基酸取代包括用非天然存在的氨基酸或二十种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物(例如,4-羟基脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟基赖氨酸)的取代。可以使用本领域公知的遗传或化学方法产生氨基酸突变。遗传方法可包括定点诱变、PCR、基因合成等。预期,通过除基因工程化之外的方法(如化学修饰)改变氨基酸侧链基团的方法也可能是有用的。本文可使用各种名称来表示相同的氨基酸突变。例如,从Fc结构域的329位的脯氨酸到甘氨酸的取代可以表示为329G、G329、G₃₂₉、P329G或Pro329Gly。

[0115] 本文的术语“抗体”以最广义来使用,且包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。因此,在本发明的上下文中,术语抗体涉及完整的免疫球蛋白分子以及这些免疫球蛋白分子的部分。此外,如本文所讨论的,该术语涉及修饰的和/或改变的抗体分子,特别是突变的抗体分子。该术语还涉及重组或合成产生/合成的抗体。在本发明的上下文中,术语抗体可与术语免疫球蛋白互换使用。

[0116] “抗体片段”是指非完整抗体的分子,其包含完整抗体的部分,所述部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、双抗体(diabody)、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv),以及单结构域抗体。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Plückthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994);也参见WO 93/16185;和美国专利号5,571,894和5,587,458。双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见,例如,EP404,097;WO 1993/01161;Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003);和Hollinger等,Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。在Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003)中也描述了三抗体(Tribody)和四抗体(Tetrabody)。单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见例如美国专利号6,248,516B1)。抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如,大肠杆菌或噬菌体)生产,如本文所述。

[0117] 如本文所用,术语“抗原结合分子”在其最广泛的意义上是指特异性结合抗原决定簇的分子。抗原结合分子的实例是免疫球蛋白和衍生物,例如其片段,以及抗原结合受体及其衍生物。

[0118] 如本文所用,术语“抗原结合部分”是指特异性结合抗原决定簇的多肽分子。在一个实施方案中,抗原结合部分能够将与其连接的实体(例如,免疫球蛋白或抗原结合受体)引导至靶位点,例如带有抗原决定簇的特定类型的肿瘤细胞或肿瘤基质、或结合肿瘤细胞上的抗原决定簇的免疫球蛋白。在另一个实施方案中,抗原结合部分能够通过其靶抗原激活信号传导,例如在抗原决定簇与T细胞上的抗原结合受体结合时激活信号传导。在本发明的上下文中,抗原结合部分可以包括在抗体及其片段中、以及如本文进一步定义的抗原结合受体及其片段中。抗原结合部分包括抗原结合结构域,其包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。在某些实施方案中,抗原结合部分可包含如本文进一步定义且本领域已知的免疫球蛋白恒定区。有用的重链恒定区包括五种同种型中的任何一种: α , δ , ϵ , γ 或 μ 。有用的轻链恒定区包括两种同种型中的任何一种: κ 和 λ 。

[0119] 在本发明的上下文中,术语“抗原结合受体”涉及包含锚定跨膜结构域和包含至少一个抗原结合部分的胞外结构域的抗原结合分子。抗原结合受体可以由来自不同来源的多肽部分组成。因此,它也可以理解为“融合蛋白”和/或“嵌合蛋白”。通常,融合蛋白是通过连接最初编码单独蛋白质的两个或更多个基因(或优选cDNA)形成的蛋白质。该融合基因(或融合cDNA)的翻译产生单一多肽,优选具有源自每种初始蛋白质的功能特性。通过重组DNA技术人工产生了重组融合蛋白,用于生物研究或治疗。下文描述了本发明的抗原结合受体的更多细节。在本发明的上下文中,CAR(嵌合抗原受体)被理解为包含胞外部分的抗原结合受体,所述胞外部分包含通过间隔序列与锚定跨膜结构域融合的抗原结合部分,所述锚定跨膜结构域本身与CD3z和CD28的胞内信号传导结构域融合。

[0120] “抗原结合位点”是指抗原结合分子的位点,即一个或多个氨基酸残基,其提供与抗原的相互作用。例如,抗体或抗原结合受体的抗原结合位点包含来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基。天然免疫球蛋白分子通常具有两个抗原结合位点;Fab或scFv分子通常具有单个抗原结合位点。

[0121] 术语“抗原结合结构域”是指抗体或抗原结合受体的一部分,其包含与抗原的部分或全部特异性结合并互补的区域。抗原结合结构域可以由例如一个或多个免疫球蛋白可变结构域(也称为可变区)提供。特别地,抗原结合结构域包含免疫球蛋白轻链可变区(VL)和免疫球蛋白重链可变区(VH)。

[0122] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与结合抗原的免疫球蛋白重链或轻链结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守构架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见,例如,Kindt等,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co,第91页(2007年)。单个VH或VL结构域通常足以赋予抗原结合特异性。

[0123] 如本文所用的术语“ATM”是指“锚定跨膜结构域”,其定义了能够整合在细胞的(细胞)膜中的多肽链。ATM可以与其他胞外和/或胞内多肽结构域融合,其中这些胞外和/或胞内多肽结构域也将被限制在细胞膜上。在本发明的抗原结合受体中,ATM赋予本发明抗原结合受体的膜附着和限制。本发明的抗原结合受体包含至少一个ATM和包含抗原结合部分的

胞外结构域。另外,ATM可以与其他胞内信号传导结构域融合。

[0124] 在本发明的抗原结合受体中使用的术语“结合”定义了“抗原相互作用位点”和抗原彼此的结合(相互作用)。根据本发明的抗原结合受体,术语“抗原相互作用位点”定义多肽的基序,其显示与特定抗原或特定一组抗原(即,突变的Fc结构域)的特异性相互作用的能力。所述结合/相互作用也被理解为定义“特异性识别”。根据本发明,术语“特异性识别”是指抗原结合受体能够特异地与本文定义的修饰分子相互作用和/或结合,而不识别未修饰的分子。抗原结合受体的抗原结合部分可以识别同一分子上的不同表位,与其相互作用和/或结合。该术语涉及抗原结合受体的特异性,即其区分本文定义的修饰分子的特定区域(即,突变的Fc结构域)的能力。抗原相互作用位点与其特异性抗原的特异性相互作用可以导致信号的启动,例如,通过诱导包含抗原的多肽构象的改变、包含抗原的多肽的寡聚化、抗原结合受体的寡聚化等。因此,作为其一级、二级或三级结构的结果以及所述结构的二级修饰的结果,抗原相互作用位点的氨基酸序列中的特定基序和抗原彼此结合。因此,术语结合不仅涉及线性表位,还可涉及构象表位、结构表位或由靶分子的两个区域或其部分组成的不连续表位。在本发明的内容中,构象表位由在初级序列中分开的两个或更多个离散氨基酸序列限定,当多肽折叠成天然蛋白质时,所述氨基酸序列在分子表面上聚集在一起(Sela, Science 166 (1969), 1365 和 Laver, Cell 61 (1990), 553-536)。此外,术语“结合”在本发明的内容中可与术语“与...相互作用”互换使用。抗原结合受体或抗体的抗原结合部分(例如Fab或scFv结构域)与特定靶抗原决定簇结合的能力可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员熟悉的其他技术,例如表面等离子共振(SPR)技术(在BIAcore仪器上分析)(Liljeblad等,Glyco J 17, 323-329 (2000))和传统的结合测定(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))来测量。在一个实施方案中,抗原结合部分与无关蛋白的结合程度比抗原结合部分与靶抗原的结合低约10%,特别是通过SPR测量时。在某些实施方案中,结合靶抗原的抗原结合部分具有 $\leq 1\mu M$, $\leq 100nM$, $\leq 10nM$, $\leq 1nM$, $\leq 0.1nM$, $\leq 0.01nM$ 或 $\leq 0.001nM$ 的解离常数(K_d) (例如, $10^{-8}M$ 或更低,例如, $10^{-8}M$ 至 $10^{-13}M$,例如, $10^{-9}M$ 至 $10^{-13}M$)。根据本发明使用的术语“特异性结合”是指本发明的分子不与相似结构的(多)肽(即,未突变的亲本Fc结构域)交叉反应或基本上不交叉反应,其中本发明抗原结合受体能够与突变的Fc结构域特异性结合。因此,本发明的抗原结合受体特异地与突变Fc结构域结合/相互作用。可以测试一组正在研究的构建体的交叉反应性,例如,通过在常规条件下评估一组抗原结合部分与目标突变Fc结构域以及与亲本未突变Fc结构域的结合(参见,例如,Harlow和Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988) 和 Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1999))。只有与目标突变Fc结构域结合但不与或基本上不与未突变亲本Fc结构域结合的那些构建体(即Fab片段, scFv等)才被认为对目标突变Fc结构域是特异性的,并且选择用于根据本文所提供的方法进一步研究。这些方法尤其可以包括结合研究、使用结构和/或功能上密切相关的Fc结构域的阻断和竞争研究。结合研究还包括FACS分析、表面等离子体共振(SPR, 例如用BIAcore®)、分析性超速离心、等温滴定量热法、荧光各向异性、荧光光谱法、或放射性标记的配体结合测定法。

[0125] 如本文所用的术语“CDR”涉及“互补决定区”,其在本领域中是公知的。CDR是免疫球蛋白或抗原结合受体的一部分,其决定所述分子的特异性并与特定配体接触。CDR是分子

中变化最大的部分，并且贡献这些分子的抗原结合多样性。每个V结构域中有三个CDR区，CDR1, CDR2和CDR3。CDR-H描绘可变重链的CDR区，且CDR-L涉及可变轻链的CDR区。VH表示可变重链，而VL表示可变轻链。Ig来源区域的CDR区可以如“Kabat”(Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第5版，NIH Publication no.91-3242US Department of Health and Human Services (1991) ; Chothia J.Mol.Biol.196 (1987) , 901-917) 或“Chothia”(Nature 342 (1989) , 877-883) 中所述的来确定。

[0126] 术语“CD3z”是指T细胞表面糖蛋白CD3 ζ 链，也称为“T细胞受体T3 ζ 链”和“CD247”。

[0127] 术语“嵌合抗原受体”或“嵌合受体”或“CAR”是指通过间隔序列与CD3z和CD28的胞内信号传导结构域融合的抗原结合部分(例如单链抗体结构域)的胞外部分组成的抗原结合受体。本发明另外提供抗原结合受体，其中抗原结合部分是Fab或交叉Fab片段。术语“CAR”以其最广泛的形式理解为包含由与CD3z及其片段和CD28及其片段融合的胞外部分组成的抗原结合受体，其中所述胞外部分包含抗原结合部分，其中所述融合任选通过一个或几个肽接头进行。

[0128] 抗体或免疫球蛋白的“类别”是指其重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五种主要类型的抗体：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，并且这些中的一些可以进一步分为亚类(同种型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α , δ , ϵ , γ 和 μ 。

[0129] “交叉Fab分子”(也称为“交叉Fab”或“交叉Fab片段”)是指其中Fab重链和轻链的可变区或恒定区交换的Fab分子，即交叉Fab片段包含由轻链可变区和重链恒定区组成的肽链以及由重链可变区和轻链恒定区组成的肽链。为了清楚，在其中Fab轻链和Fab重链的可变区交换的交叉Fab片段中，包含重链恒定区的肽链在本文中称为交叉Fab分子的重链。相反，在其中Fab轻链和Fab重链的恒定区交换的交叉Fab中，包含重链可变区的肽链在本文中称为交叉Fab片段的重链。因此，交叉Fab片段包含由重链可变区和轻链恒定区组成的重链或轻链(VH-CL)，以及由轻链可变区和重链恒定区组成的重链或轻链(VL-CH1)。与此相对，“常规Fab”分子是指天然形式的Fab分子，即，包含由重链可变区和恒定区组成的重链(VH-CH1)，以及由轻链可变区和恒定区组成的轻链(VL-CL)。

[0130] 如本文所用的术语“CSD”是指共刺激信号传导结构域。

[0131] 术语“效应子功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物活性，其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、抗原呈递细胞的免疫复合物介导的抗原摄取、细胞表面受体(例如，B细胞受体)的下调和B细胞激活。

[0132] 如本文所用的，术语“工程”，“工程化的”，“工程化”被认为包括肽骨架的任何操作或天然存在的或重组的多肽或其片段的翻译后修饰。工程化包括氨基酸序列、糖基化模式或单个氨基酸的侧链基团的修饰，以及这些的组合。

[0133] 术语“表达盒”是指重组或合成产生的多核苷酸，具有一系列允许特定核酸在靶细胞中转录的特定核酸元件。重组表达盒可以掺入质粒、染色体、线粒体DNA、质体DNA、病毒或核酸片段中。通常，表达载体的重组表达盒部分特别包括待转录的核酸序列和启动子。在某些实施方案中，本发明的表达盒包含编码本发明的抗原结合分子或其片段的多核苷酸序

列。

[0134] “Fab分子”是指由抗原结合分子的重链的VH和CH1结构域(“Fab重链”)以及轻链的VL和CL结构域(“Fab轻链”)组成的蛋白质。

[0135] 本文的术语“Fc结构域”或“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链中含有至少一部分恒定区的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管IgG重链Fc区的边界可能略有不同,但人IgG重链Fc区通常定义为从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C-末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。

[0136] 除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据“EU编号”系统,也称为EU索引,如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中描述的。如本文所用的Fc结构域的亚基是指形成二聚Fc结构域的两个多肽之一,即包含能够稳定自我结合的免疫球蛋白重链的C-端恒定区的多肽。例如,IgG Fc结构域的亚基包含IgG CH2和IgG CH3恒定结构域。

[0137] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR域组成:FR1,FR2,FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以下列顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0138] 术语“全长抗体”表示由两条“全长抗体重链”和两条“全长抗体轻链”组成的抗体。“全长抗体重链”是在N-末端至C-末端方向由以下组成的多肽:抗体重链可变区(VH)、抗体重链恒定结构域1(CH1)、抗体铰链区(HR)、抗体重链恒定结构域2(CH2)和抗体重链恒定结构域3(CH3),缩写为VH-CH1-HR-CH2-CH3;以及在IgE亚类抗体的情况下,任选地,抗体重链恒定结构域4(CH4)。

[0139] 优选,“全长抗体重链”是在N-末端至C-末端方向由VH、CH1、HR、CH2和CH3组成的多肽。“全长抗体轻链”是以N-末端至C-末端方向由抗体轻链可变结构域(VL)和抗体轻链恒定结构域(CL)组成的多肽,缩写为VL-CL。抗体轻链恒定结构域(CL)可以是κ(kappa)或λ(lambda)。两条全长抗体链通过CL结构域和CH1结构域之间以及全长抗体重链的铰链区之间的多肽间二硫键连接在一起。典型的全长抗体的实例是天然抗体,如IgG(例如IgG 1和IgG 2)、IgM、IgA、IgD和IgE。根据本发明使用的全长抗体可以来自单一物种,例如,人类,或它们可以是嵌合的或人源化抗体。在一些实施方案中,根据本发明使用的全长抗体,即,包含突变Fc结构域的治疗抗体,包含两个抗原结合位点,各自由一对VH和VL形成,其都特异性地结合同一抗原。在其他实施方案中,根据本发明使用的全长抗体包含两个抗原结合位点,各自由一对VH和VL形成,其中两个抗原结合位点结合不同的抗原,例如,其中抗体是双特异性的。所述全长抗体的重链或轻链的C-末端是指,所述重链或轻链C末端的最后一个氨基酸。

[0140] “融合”表示,组分(例如,Fab和跨膜结构域)通过肽键,直接地或通过一个或多个肽接头连接。

[0141] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指其中已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和由其衍生的后代,而不考虑传代次数。后代可能与亲代细胞的核酸内容物不完全相同,而是可以含有突变。本文包括具有与最初转化细胞中筛选或选择的功能或

生物活性相同的功能或生物活性的突变后代。宿主细胞是可用于产生根据本发明使用的抗体的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞,例如哺乳动物培养细胞,如CHO细胞、BHK细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、Y0骨髓瘤细胞、P3X63小鼠骨髓瘤细胞、PER细胞、PER.C6细胞或杂交瘤细胞、酵母细胞、昆虫细胞和植物细胞(这些仅是几个例子),还包括包含在转基因动物、转基因植物或培养的植物或动物组织内的细胞。

[0142] 如本文所用,术语“超变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的如下每个区域,所述区域在序列上是超变的和/或形成结构上限定的环(“高变环”)。通常,天然四链抗体包含六个HVR;VH中的三个(H1、H2、H3)和VL中的三个(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自超变环和/或来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列可变性和/或参与抗原识别。除VH中的CDR1外,CDR通常包含形成超变环的氨基酸残基。超变区(HVR)也称为互补决定区(CDR),并且这些术语在本文中可互换用于指形成抗原结合区的可变区部分。该特定区域已由Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,Sequences of Proteins of Immunological Interest(1983)和Chothia等,J Mol Biol 196:901-917(1987)描述,其中当相互比较时这些定义包括了氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任何定义来提及抗体和/或抗原结合受体或其变体的CDR,均旨在包括在本文定义和使用的此术语的范围内。作为比较,包括了上文引用的每篇参考文献所定义的CDR的合适氨基酸残基列于下表1中。包括特定CDR的确切残基数将根据CDR的序列和大小而变化。在给定抗体的可变区氨基酸序列的情况下,本领域技术人员可以常规地确定哪些残基包含特定CDR。

[0143] 表1.CDR定义¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM²
[0144] V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
	50-65	52-58	50-58
	95-102	95-102	95-102
[0145] V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
	50-56	50-52	50-56
	89-97	91-96	89-97

[0146] ¹表1中所有CDR定义的编号是根据Kabat等列出的编号惯例(参见下文)。

[0147] ²如表1中使用的“AbM”具有小写“b”,是指通过Oxford Molecular的“AbM”抗体建模软件定义的CDR。

[0148] Kabat等还定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员可以明确地将该Kabat编号系统分配给任何可变区序列,而不依赖于序列本身之外的任何实验数据。如本文所用的,“Kabat编号”是指Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)所述的编号系统。除非另有说明,否则提及抗原结合部分可变区中特定氨基酸残基位置的编号是根据Kabat编号系统。序列表中的多肽序列未根据Kabat编号系统编号。然而,本领域普通技术人员完全能够将序列表的序列编号转换为Kabat编号。

[0149] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如,牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人类和非人类灵长类动物,例如猴子)、兔子和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。特别地,个体或受试者是人。

[0150] “分离的核酸”分子或多核苷酸是指已从其天然环境中取出的核酸分子、DNA或RNA。例如,对于本发明的目的,认为载体中包含的编码多肽的重组多核苷酸是分离的。分离的多核苷酸的其他实例包括维持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液中纯化的(部分或基本上纯化的)多核苷酸。分离的多核苷酸可以包括这样的多核苷酸分子,其包含在通常含有该多核苷酸分子的细胞中,但存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置上。分离的RNA分子包括本发明的体内或体外RNA转录物,以及正链和负链形式,以及双链形式。根据本发明的分离的多核苷酸或核酸还包括合成产生的这种分子。另外,多核苷酸或核酸可以是或可以包括调节元件,例如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0151] 与本发明的参考核苷酸序列具有至少例如95%“相同”的核苷酸序列的核酸或多核苷酸,意指:该多核苷酸序列可以包括按参考核苷酸序列的每100个核苷酸计最多五个点突变,除此之外,该多核苷酸的核苷酸序列与参考序列相同。换句话说,为了获得与参考核苷酸序列具有至少95%相同的核苷酸序列的多核苷酸,参考序列中多达5%的核苷酸可以缺失或被另外的核苷酸取代,或可以将多达参考序列中总核苷酸数目5%的核苷酸插入到参考序列中。参考序列的这些改变可以发生在参考核苷酸序列的5'或3'末端位置、或这些末端位置之间的任何位置,独自散布在参考序列的残基之间或参考序列内的一个或多个连续基团中。实际上,任何特定的多核苷酸序列是否与本发明的核苷酸序列至少80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%相同,可以使用已知的计算机程序常规确定,例如以下针对多肽讨论的程序(例如,ALIGN-2)。

[0152] “分离的多肽”或其变体或衍生物是指,在其天然环境中的多肽。无特定的纯化水平的要求。例如,可以从其天然或天然环境中取出分离的多肽。对于本发明的目的,认为在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质是分离的,已经通过任何合适的技术分离、分级或部分或基本上纯化的天然或重组多肽也是分离的。

[0153] 相对于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为,在比对序列和引入缺口(如果需要)以获得最大百分比序列同一性后,并且在不考虑任何保守性取代作为序列同一性的一部分时,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为了确定氨基酸序列同一性百分比的目的,可以以本领域技术范围内的各种方式实现比对。例如,使用公共可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。

[0154] 本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的全长序列上实现最大比对所需的任何算法。然而,对于本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc.编写,并且源代码已经在美国版权局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559中的用户文档中提交,其在美国版权登记号No.TXU510087下注册。ALIGN-2程序可从加利福尼亚州南旧金山的Genentech, Inc.公开获得,或者可以从源代码编译。应编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统上使用,包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,并且不变。在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,如下计算给定氨基酸序列A与或相对给定氨基酸

序列B的%氨基酸序列同一性(或者可以表述为:给定氨基酸序列A与或相对给定氨基酸序列B具有或包含特定%氨基酸序列同一性):

[0155] $100 \times \text{分数X/Y}$

[0156] 其中X是序列比对程序ALIGN-2在A和B的程序比对中得到的相同匹配的氨基酸残基数,其中Y是B中的氨基酸残基总数。可以理解,氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的%氨基酸序列同一性不等于B与A的%氨基酸序列同一性。除非另有说明,否则本文使用的全部%氨基酸序列同一性值如前一段中所述的使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0157] 术语“核酸分子”涉及,组成多核苷酸的碱基(包括嘌呤-和嘧啶碱基)的序列,其中所述碱基代表核酸分子的一级结构。本文中,术语核酸分子包括DNA、cDNA、基因组DNA、RNA、合成形式的DNA和包含两种或更多种这些分子的混合聚合物。此外,术语核酸分子包括有义链和反义链两者。此外,本文所述的核酸分子可含有非天然或衍生的核苷酸碱基,这是本领域技术人员将容易理解的。

[0158] 术语“包装说明书”用于指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其包含关于使用这些治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌症和/或警告的信息。

[0159] 术语“药物组合物”是指这样的制剂,其形式使得其中所含活性成分的生物活性有效,并且其不含对施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的其它组分。药物组合物通常包含一种或多种药学上可接受的载体。

[0160] “药学上可接受的载体”是指药物组合物中除活性成分外的成分,其对受试者无毒。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0161] 如本文使用的,术语“多肽”是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)组成的分子。术语多肽是指具有两个或更多个氨基酸的任何链,并且不是指产物的特定长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、蛋白质、氨基酸链或用于指代两个或更多个氨基酸的链的任何其他术语,均包括在多肽的定义内,并且术语多肽可以用于替代这些术语中的任何一个,或与这些术语中的任何一个互换。术语多肽还意指多肽的表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团的衍生、蛋白水解、或通过非天然存在的氨基酸修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生,但不一定从指定的核酸序列翻译。它可以以任何方式产生,包括通过化学合成。本发明的多肽可以是约3或更多,5或更多,10或更多,20或更多,25或更多,50或更多,75或更多,100或更多,200或更多,500或更多,1,000或更多,或2,000或更多个氨基酸的大小。多肽可以,但不一定,具有有限定的三维结构。具有有限定的三维结构的多肽被称为折叠的,并且不具有有限定的三维结构、而是可以采用大量不同构象的多肽被称为未折叠的。

[0162] 术语“多核苷酸”是指分离的核酸分子或构建体,例如,信使RNA(mRNA)、病毒衍生的RNA或质粒DNA(pDNA)。多核苷酸可包含常规磷酸二酯键或非常规键(例如,酰胺键,如在肽核酸(PNA)中)。术语核酸分子可以指多核苷酸中存在的任何一个或多个核酸区段,例如,DNA或RNA片段。

[0163] “降低的结合”,例如,降低的Fc受体结合,是指对于相应的相互作用而言亲和力降低,例如通过SPR测量的。为清楚起见,该术语还包括将亲和力降低至零(或低于分析方法的检测限),即完全消除相互作用。相反,“增加的结合”是指对于相应的相互作用而言结合亲

和力的增加。

[0164] 术语“调控序列”是指DNA序列，其是实现与其连接的编码序列表达所必需的。这种控制序列的性质根据宿主生物而不同。在原核生物中，控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和终止子。在真核生物中，通常控制序列包括启动子、终止子，并且在一些情况下，包括增强子、反式激活子或转录因子。术语“控制序列”旨在至少包括其存在是表达所必需的所有组分，并且还可包括其他有利组分。

[0165] 如本文使用的，术语“单链”是指包含由肽键线性连接的氨基酸单体的分子。在某些实施方案中，抗原结合部分之一是scFv片段，即，通过肽接头连接的VH结构域和VL结构域。在某些实施方案中，抗原结合部分之一是单链Fab分子，即，其中Fab轻链和Fab重链通过肽键连接形成单个肽链的Fab分子。在特别的这样的实施方案中，在单链Fab分子中，Fab轻链的C-末端连接Fab重链的N-末端。

[0166] 如本文使用的术语“SSD”是指刺激信号传导结构域。

[0167] 如本文所用的，“治疗(treatment)”(及其语法变体，如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变待治疗个体的疾病的自然病程的临床干预，并且可以针对预防进行或在临床病理学过程中进行。治疗的期望效果包括，但不限于，预防疾病的发生或复发、症状的缓解、疾病的任何直接或间接病理后果的减少、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或缓解疾病状态，以及缓解或改善预后。在一些实施方案中，将表达本发明的抗原结合受体的细胞，与包含突变Fc结构域的治疗抗体联合，用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0168] 如本文使用的，术语“靶抗原决定簇”与“靶抗原”、“靶表位”、和“靶细胞抗原”同义，并且是指，与抗体结合的多肽大分子上的位点(例如，连续的氨基酸序列链或由不同区域的非连续氨基酸构成的构象构型)，其中与抗体的结合形成抗原结合部分-抗原复合物。有用的抗原决定簇可以出现在例如肿瘤细胞表面、病毒感染细胞表面、其他患病细胞表面、免疫细胞表面，游离在血清中和/或在胞外基质(ECM)中。除非另有说明，本文称为抗原的蛋白质(例如，CD20、CEA、FAP、TNC)可以是来自任何脊椎动物来源的任何天然形式的蛋白质，所述脊椎动物包括哺乳动物，如灵长类动物(例如，人)和啮齿动物(例如，小鼠和大鼠)。在一个具体实施方案中，靶抗原是人蛋白质。当提及本文中的特定靶蛋白时，该术语包括“全长”、未加工的靶蛋白，以及由靶细胞中的加工产生的任何形式的靶蛋白。该术语还包括天然存在的靶蛋白变体，例如剪接变体或等位基因变体。可用作抗原的示例性人靶蛋白包括但不限于：CD20、CEA、FAP、TNC、MSLN、Fo1R1、HER1和HER2。抗体结合特定靶抗原决定簇的能力可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员熟悉的其他技术测量，例如表面等离子共振(SPR)技术(在BIAcore仪器上分析)(Liljeblad等，Glyco J 17, 323-329(2000))和传统的结合测定(Heeley, Endocr Res 28, 217-229(2002))。在一个实施方案中，抗体与无关蛋白的结合程度小于抗体与靶抗原结合的约10%，例如通过SPR测量的。在某些实施方案中，抗体以 $\leq 1\mu M$, $\leq 100nM$, $\leq 10nM$, $\leq 1nM$, $\leq 0.1nM$, $\leq 0.01nM$, 或 $\leq 0.001nM$ (例如, $10^{-8}M$ 或更低，例如, $10^{-8}M$ 至 $10^{-13}M$ ，例如, $10^{-9}M$ 至 $10^{-13}M$)的亲和解离常数(K_D)结合靶抗原。

[0169] 根据本发明，“包含突变Fc结构域的抗体”，即，治疗抗体可以具有一个、两个、三个或更多个结构域并且可以是单特异性、双特异性或多特异性的。抗体可以是来自单个物种

的全长抗体,或是嵌合或人源化的。对于具有超过两个抗原结合结构域的抗体,一些结合结构域可以是相同的和/或具有相同的特异性。

[0170] 如本文使用的,“T细胞激活”是指T淋巴细胞,特别是细胞毒性T淋巴细胞的一种或多种细胞应答,选自:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒活性和活化标志物的表达。本发明的抗原结合受体能够诱导T细胞激活。用于测量T细胞激活的合适测定法在本文描述,并是本领域中已知的。

[0171] 根据本发明,术语“T细胞受体”或“TCR”在本领域中是公知的。特别地,本文的术语“T细胞受体”是指任何T细胞受体,条件是满足以下三个标准:(i)肿瘤特异性,(ii)识别(大多数)肿瘤细胞,这意味着抗原或靶标应在(大多数)肿瘤细胞中表达,和(iii)TCR与待治疗个体的HLA型相匹配。在这种情况下,满足上述三个标准的合适的T细胞受体是本领域已知的,如识别NY-ESO-1(序列信息,参见例如PCT/GB2005/001924)和/或HER2neu(序列信息,参见WO-A1 2011/0280894)的受体。

[0172] 药剂(例如药物组合物)的“治疗有效量”,是指在必要的剂量和时间段内有效实现所需治疗或预防结果的量。药剂的治疗有效量可以例如消除、减少、延迟、最小化或防止疾病的不利影响。

[0173] 术语“载体”或“表达载体”与“表达构建体”同义,并且是指用于引入和指导与其可操作地连接的特定基因在靶细胞中表达的DNA分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其中的宿主细胞基因组中的载体。本发明的表达载体包含表达盒。表达载体允许转录大量稳定的mRNA。一旦表达载体在靶细胞内,由该基因编码的核糖核酸分子或蛋白质将由细胞转录和/或翻译机制产生。在一个实施方案中,本发明的表达载体包含表达盒,其包含编码本发明的抗原结合受体或其片段的多核苷酸序列。

[0174] 能够特异性结合一个或多个突变Fc结构域的抗原结合受体

[0175] 本发明涉及能够特异性结合抗体(即,靶向癌细胞的治疗抗体)的突变Fc结构域的抗原结合受体。特别地,本发明涉及包含胞外结构域的抗原结合受体,所述胞外结构域包含至少一个能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合亲本未突变Fc结构域的抗原结合部分。在优选实施方案中,突变Fc结构域与未突变亲本Fc结构域相比包含至少一个氨基酸置换,其中与通过未突变Fc结构域的Fc受体结合相比,通过突变Fc结构域的Fc受体结合降低。在特别的实施方案中,本发明涉及包含胞外结构域的抗原结合受体,所述胞外结构域包含至少一个能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分,其中所述至少一个抗原结合部分不能特异性结合亲本未突变Fc结构域,其中突变Fc结构域包含至少一个选自L234、L235、I253、H310、P331、P329和H435的氨基酸置换,特别是其中与未突变亲本Fc结构域相比,氨基酸突变是L234A、L235A、I253A、N297A、H310A、P329G和/或H435A,其中与通过未突变Fc结构域的Fc受体结合相比,通过突变Fc结构域的Fc受体结合降低。在一个优选实施方案中,氨基酸突变是P329G,其中Fc γ 受体结合降低,如在25°C下通过SPR测量的。在进一步优选的实施方案中,氨基酸突变是I253A、H310A和H435A,其中亲生儿Fc受体(FcRn)结合降低,如在25°C下通过SPR测量的。

[0176] 本发明进一步涉及:使用本文所述的抗原结合受体转导T细胞(如CD8+T细胞、CD4+T细胞、CD3+T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或自然杀伤(NK)T细胞,优选CD8+T细胞),及所述转导T细胞通过包含突变Fc结构域的抗体分子(例如,治疗抗体)的靶向募集,例如,募集至肿瘤。在一个

实施方案中,抗体能够特异性结合肿瘤细胞表面上天然产生的肿瘤特异性抗原。

[0177] 如所附实施例中所示的,作为本发明概念的证明,根据本发明构建了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体pETR17096 (SEQ ID NO:7,由SEQ ID NO:19中所示的DNA序列编码),其能够特异性结合包含P329G突变的治疗抗体(由包含SEQ ID NO:112的重链和SEQ ID NO:113的轻链的抗CD20抗体示例)。可以通过与Fc结构域中包含P329G突变的抗CD20抗体以及CD20阳性肿瘤细胞共同孵育,强烈地激活表达抗-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD蛋白(SEQ ID NO:7,由SEQ ID NO:19中所示的DNA序列编码)的转导T细胞(Jurkat NFAT T细胞)。本发明人进一步提供了更多形式的能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的抗原结合受体,以支持本发明概念的证明。

[0178] 使用抗肿瘤抗原的抗体(其中抗体包含P329突变)与表达抗-P329G-Fab-ds-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD蛋白(SEQ ID NO:44(DNA)和39,41(蛋白质))的转导T细胞组合处理肿瘤细胞,令人惊讶地导致,与表达抗-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD(SEQ ID NO:19(DNA)和7(蛋白质))融合蛋白的转导T细胞相比,更强的转导T细胞激活(参见,例如,图6和8-11)。

[0179] 因此,令人惊讶地和出乎意料地发现,用本发明的抗原结合受体转导的T细胞,优选CD8+T细胞,可以通过包含突变Fc结构域的肿瘤特异性抗体而被特异地刺激,并通过该肿瘤特异性抗体作为连接元件而被募集至肿瘤细胞。因此,在本发明中令人惊讶地和出乎意料地证实,将包含突变Fc结构域的肿瘤特异性抗体(即,治疗抗体),与转导了包含胞外结构域/由胞外结构域组成(其中所述胞外结构域包含能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分)的抗原结合受体的T细胞配对,可以导致T细胞的特异性激活和随后的肿瘤细胞裂解。这种方法具有优于常规基于T细胞的方法的显著安全性优势,因为T细胞在不存在包含突变Fc结构域的抗体的情况下是惰性的,并且其可用性可以通过选定的抗体分子形式来控制(即,较小的分子用于较短半衰期,反之亦然)。因此,本发明提供了一种通用治疗平台,其中IgG型抗体可以用于标记或标注肿瘤细胞作为T细胞的引导,并且其中通过提供针对IgG型抗体的突变Fc结构域的特异性,转导的T细胞可以特异地靶向肿瘤细胞。结合肿瘤细胞表面上的抗体的突变Fc结构域后,本文所述的转导T细胞将被激活并且肿瘤细胞随后将被裂解。该平台是灵活的并且是特异性的,其允许使用各种(现有的或新研发的)靶抗体,或共应用具有不同抗原特异性但在Fc结构域中包含相同突变的多种抗体。可以通过调节共应用的治疗抗体的剂量或通过转换成不同的抗体特异性或形式来进一步调节T细胞激活的程度。没有共同施用包含突变Fc结构域的靶向抗体时,根据本发明的转导T细胞是惰性的,这是因为本文所述的Fc结构域突变在天然或未突变免疫球蛋白中不存在。因此,在一个实施方案中,突变Fc结构域不天然出现在野生型免疫球蛋白中。

[0180] 因此,本发明涉及包含胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含至少一个能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分,其中所述至少一个抗原结合部分不能特异性结合亲本未突变Fc结构域,其中突变Fc结构域与未突变亲本Fc结构域相比包含至少一个氨基酸突变,其中与由突变Fc结构域诱导的Fc受体结合和/或效应子功能相比,突变Fc结构域的Fc受体结合和/或由突变Fc结构域诱导的效应子功能降低。可能特别期望的是,在癌症治疗中使用具有降低的效应子功能的治疗抗体,因为效应子功能可能导致基于抗体的肿瘤治疗具有严重的副作用,如本文进一步描述的。

[0181] 在本发明中,抗原结合受体包含不在T细胞中或T细胞上天然存在的胞外结构域。因此,抗原结合受体能够提供定制的针对表达本发明抗原结合受体的细胞的结合特异性。用本发明的一种或多种抗原结合受体转导的细胞(例如,T细胞)变得能够特异性结合突变Fc结构域,但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。特异性由抗原结合受体的胞外结构域的抗原结合部分提供,这样的抗原结合部分被认为对于本文定义的突变Fc结构域是特异性的。在本发明中并且如本文解释的,能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分结合突变Fc结构域/与突变Fc结构域相互作用,但不结合未突变亲本Fc结构域/不与未突变亲本Fc结构域相互作用。

[0182] 抗原结合部分

[0183] 在本发明的举例说明性实施方案中,作为概念的证明,提供了包含锚定跨膜结构域和含至少一个抗原结合部分的胞外结构域的抗原结合受体,其中至少一个抗原结合部分能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域,其中与未突变亲本Fc相比,突变Fc结构域包含至少一个氨基酸置换。

[0184] 在某些实施方案中,至少一个抗原结合部分是常规Fab片段,即,由Fab轻链和Fab重链组成的Fab分子。在某些实施方案中,至少一个抗原结合部分是交叉Fab片段,即由Fab轻链和Fab重链组成的Fab分子,其中Fab重链和轻链的可变区或恒定区被交换。在某些实施方案中,至少一个抗原结合部分是scFv片段。在特别的这样的实施方案中,scFv分子中的可变重链(VH)的C-末端连接可变轻链(VL)的N-末端,任选通过肽接头连接。在某些实施方案中,至少一个抗原结合部分是单链Fab分子,即,其中Fab轻链和Fab重链通过肽接头连接形成单个肽链的Fab分子。在特别的这样的实施方案中,单链Fab分子中的Fab轻链的C-末端连接Fab重链的N-末端,任选通过肽接头连接。

[0185] 因此,在本发明中,抗原结合部分能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域,其中与未突变亲本Fc结构域相比,突变Fc结构域包含至少一个氨基酸置换。

[0186] 可以通过免疫例如哺乳动物免疫系统来产生能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分。这样的方法是本领域已知的并且例如描述于Burns, Methods Biology 295:1-12 (2005) 中。或者,可以通过针对所需的一种或多种活性筛选抗体组合文库来分离本发明的抗原结合部分。用于筛选组合文库的方法综述于例如Lerner等,Nature Reviews 16: 498-508 (2016) 中。例如,用于产生噬菌体展示文库和针对具有所需结合特征的抗原结合部分来筛选此文库的各种方法,是本领域已知的。这样的方法综述例如Frenzel等,mAbs 88: 1177-1194 (2016);Bazan等,Human Vaccines and Immunotherapeutics 8:1817-1828 (2012) 和Zhao等,Critical Reviews in Biotechnology 36:276-289 (2016) 以及Hoogenboom等,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等编辑,Human Press, Totowa, NJ, 2001) 和进一步描述于例如McCafferty等,Nature 348:552-554;Clackson等, Nature 352:624-628 (1991);Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597 (1992) 以及Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo编辑,Human Press, Totowa, NJ, 2003);Sidhu等,J.Mol.Biol.338 (2):299-310 (2004);Lee等,J.Mol.Biol.340 (5): 1073-1093 (2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101 (34):12467-12472 (2004);和Lee等,J.Immunol.Methods 284 (1-2):119-132 (2004)。在某些噬菌体展示方法中,通过聚

合酶链式反应 (PCT) 分开克隆 VH 和 VL 基因的库，并在噬菌体文库中随机重组，随后筛选抗原结合性噬菌体，按照 Winter 等，Annual Review of Immunology 12:433-455 (1994) 中所述的。噬菌体通常展示抗体片段，作为单链 Fv (scFv) 片段或作为 Fab 片段。来自免疫源的文库可以提供对免疫原的高亲和力抗原结合部分，而不需要构建杂交瘤。或者，可以（例如，从人）克隆天然 (naive) 库，以提供针对广泛多种非自身以及自身抗原的单个抗原结合部分来源，而不进行任何免疫，如 Griffiths 等在 EMBO Journal 12:725-734 (1993) 中所述的。最后，还可以通过从干细胞克隆未重排的 V- 基因区段，并且使用含随机序列的 PCR 引物来编码高度可变的 CDR3 区以及完成体外重排，由此合成制得天然 (naive) 文库，如 Hoogenboom 和 Winter 在 Journal of Molecular Biology 227:381-388 (1992) 中所述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括，例如，美国专利 No. 5,750,373; 7,985,840; 7,785,903 和 8,679,490 以及美国专利公布 No. 2005/0079574、2007/0117126、2007/0237764 和 2007/0292936。本领域已知的用于从组合文库筛选具有所需的一种或多种活性的抗体的方法的更多实例，包括核糖体和 mRNA 展示，以及用于在细菌、哺乳动物细胞、昆虫细胞或酵母细胞上的抗体展示和选择的方法。用于酵母表面展示的方法综述于例如 Scholler 等，Methods in Molecular Biology 503:135-56 (2012) 和 Cherf 等，Methods in Molecular Biology 1319:155-175 (2015) 以及 Zhao 等，Methods in Molecular Biology 889:73-84 (2012)。用于核糖体展示的方法描述于例如 He 等，Nucleic Acids Research 25:5132-5134 (1997) 和 Hanes 等，PNAS 94:4937-4942 (1997)。

[0187] 在本发明中，本文提供了包含至少一个能够特异性结合突变 Fc 结构域的抗原结合部分的抗原结合受体。因此，表达根据本发明的抗原结合受体的转导细胞（即，T 细胞）能够特异性结合抗体（即，治疗抗体）的突变 Fc 结构域。Fc 结构域赋予抗体（即，治疗抗体）有利的药代动力学性质，包括长的血清半衰期，这有利于在靶组织中良好的累积和有利的组织-血液分布比例。然而，同时，其可能导致治疗抗体不合适的靶向，即，靶向表达 Fc 受体的细胞而非靶向优选的带有抗原的细胞。此外，Fc 受体信号传导途径的共同激活可能导致细胞因子释放，其在全身性施用治疗抗体时可导致细胞因子受体的过度激活和严重副作用。由于免疫细胞潜在的破坏性，（带有 Fc 受体的）免疫细胞而不是 T 细胞的激活甚至可能降低治疗抗体的功效。因此，可以将本领域已知的治疗抗体工程化或突变来呈现降低的对 Fc 受体的亲和性和/或降低的效应子功能，如例如与天然 IgG₁ Fc 结构域相比。根据本发明的抗原结合受体可以用于在体外靶向表达根据本发明的抗原结合受体的效应细胞，例如，T 细胞，和/或在体内靶向靶细胞，即，肿瘤细胞，其中所述靶细胞用能够特异性结合靶细胞的抗体标记，其中所述抗体包含本文所述的工程化的和/或突变的 Fc 结构域。

[0188] 在本发明的举例说明性实施方案中，作为概念的证明，提供了能够特异性结合包含氨基酸突变 P329G 的突变 Fc 结构域的抗原结合受体和表达所述抗原结合受体的效应细胞。P329G 突变降低与 Fc_γ 受体的结合和相关的效应子功能。因此，与未突变 Fc 结构域相比，包含 P329G 突变的突变 Fc 结构域以降低的或消除的亲和性结合 Fc_γ 受体。在本发明的备选举例说明性实施方案，作为概念的证明，提供了能够特异性结合包含氨基酸突变 I253A、H310A 和 H435A (“AAA”) 的突变 Fc 结构域的抗原结合受体。AAA 突变基本上消除了与 FcRn 的结合。

[0189] 然而，包含突变 Fc 结构域、具有降低的或改进的或减少的 Fc 受体 (FcR) 结合和/或

效应子功能的抗体，广泛用于本领域中。因此，本文提供了能够特异性结合包含突变Fc结构域的抗体的抗原结合受体，这样的抗体在本文也称为靶抗体。因此，在一个实施方案中，本发明的抗原结合受体能够特异性结合包含突变Fc结构域的具有降低的Fc受体结合亲和性和/或降低的效应子功能的靶抗体。具有降低的效应子功能的靶抗体可以包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个突变的那些抗体（美国专利No. 6,737,056）。这样的Fc突变体可以包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或多个具有突变的Fc突变体，包括残基265和297突变成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体（美国专利No. 7,332,581）。描述了具有改进的或减少的FcR结合的某些抗体变体。（参见，例如，美国专利No. 6,737,056；WO 2004/056312和Shields等，J.Biol.Chem. 9(2) :6591-6604 (2001)）。在某些实施方案中，提供了能够特异性结合抗体变体的抗原结合受体，所述抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸突变的Fc区，例如，在Fc区的位置298、333和/或334的突变（残基的EU编号）。在某些实施方案中，靶抗体变体包含具有一个或多个氨基酸突变的Fc区，所述突变降低或减少FcRn结合，例如，Fc区的位置253，和/或310，和/或435的突变（残基的EU编号）。在某些实施方案中，靶抗体变体包含在位置253、310和435具有氨基酸突变的Fc区。在一个实施方案中，突变是源自人IgG1 Fc区的Fc区中的I253A、H310A和H435A。参见，例如，Grevys, A. 等，J. Immunol. 194 (2015) 5497-5508。

[0190] 在某些实施方案中，提供了能够特异性结合包含具有一个或多个氨基酸突变的Fc区的抗体变体的抗原结合受体，所述突变降低或减少FcRn结合，例如，在Fc区的位置310和/或433和/或436中的一个的突变（残基的EU编号）。在某些实施方案中，靶抗体变体包含在位置310、433和436具有氨基酸突变的Fc区。在一个实施方案中，突变是源自人IgG1 Fc区的Fc区中的H310A、H433A和Y436A。在某些实施方案中，靶抗体变体包含具有一个或多个氨基酸突变的Fc区，所述突变提高了FcRn结合，例如，Fc区的位置252和/或254和/或256的突变（残基的EU编号）。在某些实施方案中，靶抗体变体包含在位置252、254和256具有氨基酸突变的Fc区。在一个实施方案中，突变是源自人IgG1 Fc区的Fc区中的M252Y、S254T和T256E。在某些实施方案中，提供了能够特异性结合包含具有氨基酸突变的Fc区的抗体变体的抗原结合受体，所述突变减少Fc γ 结合，例如，在Fc区的位置234、235和329的突变（残基的EU编号）。在一个实施方案中，突变是L234A和L235A（LALA）。在某些实施方案中，靶抗体变体进一步在源自人IgG1 Fc区的Fc区中包含D265A和/或P329G。在一个实施方案中，突变是源自人IgG1 Fc区的Fc区中的P329G（“PG”）。在另一个实施方案中，突变是源自人IgG1 Fc区的Fc区中的I253A、H310A和H435A（“AAA”）。

[0191] 在一个实施方案中，抗原结合部分能够特异性结合由能够稳定缔合的第一亚基和第二亚基组成的突变Fc结构域。在一个实施方案中，Fc结构域是IgG Fc结构域，特别是IgG₁或IgG₄。在一个实施方案中，Fc结构域是人Fc结构域。在一个实施方案中，如与天然IgG₁ Fc结构域相比，突变Fc结构域呈现降低的对Fc受体的结合亲和性和/或降低的效应子功能。在一个实施方案中，Fc结构域包含一个或多个氨基酸突变，所述突变降低Fc受体结合和/或效应子功能。

[0192] 在一个优选实施方案中，一个或多个氨基酸突变是在选自L234、L235和P329的一个或多个位置（Kabat编号）。在一个特别的实施方案中，Fc结构域的每个亚基包含三个氨基酸突变，所述突变降低与激活性Fc受体的结合和/或效应子功能，其中所述氨基酸突变是

L234A、L235A和P329G。在一个特别的实施方案中,Fc受体是Fc γ 受体。在一个实施方案中,效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0193] 在特别的实施方案中,突变Fc结构域包含P329G突变。因此,包含P329G突变的突变Fc结构域,与未突变Fc结构域相比,以降低或减少的亲和性结合Fc γ 受体。在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区,其包含以下的至少之一:

[0194] (a) RYWMN (SEQ ID NO:1) 的重链互补决定区 (CDR H) 1氨基酸序列;

[0195] (b) EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO:2) 的CDR H2氨基酸序列;和

[0196] (c) PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3) 的CDR H3氨基酸序列。

[0197] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含轻链可变区,其包含以下的至少之一:

[0198] (d) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4) 的轻链 (CDR L) 1氨基酸序列;

[0199] (e) GTNKRAP (SEQ ID NO:5) 的CDR L2氨基酸序列;和

[0200] (f) ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6) 的CDR L3氨基酸序列。

[0201] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含至少一个重链互补决定区(CDR)和至少一个轻链CDR,其中重链互补决定区包含与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链CDR选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的重链互补决定区(CDR)以及SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的轻链CDR。

[0202] 在一个优选实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区,其包含:

[0203] (a) RYWMN (SEQ ID NO:1) 的重链互补决定区 (CDR H) 1氨基酸序列;

[0204] (b) EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO:2) 的CDR H2氨基酸序列;和

[0205] (c) PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3) 的CDR H3氨基酸序列;

[0206] 和轻链可变区,其包含:

[0207] (d) RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4) 的轻链 (CDR L) 1氨基酸序列;

[0208] (e) GTNKRAP (SEQ ID NO:5) 的CDR L2氨基酸序列;和

[0209] (f) ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6) 的CDR L3氨基酸序列。

[0210] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区(VH)包含与选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:32的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链可变区(VL)包含与选自SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:33的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0211] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G

突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区(VH)包含选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:32的氨基酸序列,轻链可变区(VL)包含选自SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

[0212] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

[0213] 在一个优选实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0214] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分是scFv、Fab、交叉Fab或scFab片段。在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分是Fab片段。

[0215] 在优选实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中Fab片段包含SEQ ID NO:40的重链和SEQ ID NO:41的轻链。

[0216] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中至少一个抗原结合部分是scFv片段,其是由重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和接头组成的多肽,其中所述可变结构域和所述接头具有以下以N-末端至C-末端方向的构造之一:a) VH-接头-VL或b) VL-接头-VH。在优选实施方案中,scFv片段具有构造VH-接头-VL。

[0217] 在优选实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中scFv片段包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0218] 在可替换的特别的实施方案中,突变Fc结构域包含I253A、H310A和H435A(“AAA”)突变。AAA突变降低与新生儿Fc受体(FcRn)的结合。因此,与未突变Fc结构域相比,包含AAA突变的突变Fc结构域以降低的或消除的亲和性结合FcRn。

[0219] 因此,在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区,其包含以下的至少一个:

[0220] (a) SYGMS (SEQ ID NO:53) 的重链互补决定区(CDR H)1氨基酸序列;

[0221] (b) SSGGSY (SEQ ID NO:54) 的CDR H2氨基酸序列;和

[0222] (c) LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO:55) 的CDR H3氨基酸序列。

[0223] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含轻链可变区,其包含以下的至少一个:

[0224] (d) RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO:56) 的轻链(CDR L)1氨基酸序列;

[0225] (e) KVSNRFS (SEQ ID NO:57) 的CDR L2氨基酸序列;和

[0226] (f) FQGSHVPYT (SEQ ID NO:58) 的CDR L3氨基酸序列。

[0227] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含至少一个重链互补决定区(CDR)和至少一个轻链CDR,重链互补决定区(CDR)包含与选自SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链CDR选自SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:58。

[0228] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55的重链互补决定区(CDR)以及SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:58的轻链CDR。

[0229] 在优选实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区,其包含:

[0230] (a) SYGMS (SEQ ID NO:53) 的重链互补决定区(CDR H)1氨基酸序列;

[0231] (b) SSGGSY (SEQ ID NO:54) 的CDR H2氨基酸序列;

[0232] (c) LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO:55) 的CDR H3氨基酸序列;和

[0233] 轻链可变区,其包含:

[0234] (d) RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO:56) 的轻链(CDR L)1氨基酸序列;

[0235] (e) KVSNRFS (SEQ ID NO:57) 的CDR L2氨基酸序列;和

[0236] (f) FQGSHVPYT (SEQ ID NO:58) 的CDR L3氨基酸序列。

[0237] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:61的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0238] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列,轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0239] 在一个实施方案中,至少一个抗原结合部分是scFv、Fab、交叉Fab或scFab片段。在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中至少一个抗原结合部分是Fab片段。在特别的实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中Fab片段包含SEQ ID NO:64的重链和SEQ ID NO:65的轻链。

[0240] 在一个实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中至少一个抗原结合部分是scFv片段。在特别的实施方案中,抗原结合受体的胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的抗原结合部分,其中scFv片段包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0241] 在根据本发明的更多实施方案中,胞外结构域中包含的抗原结合部分是单链Fab

片段或scFab。

[0242] Fab和scFab片段通过CL结构域和CH1结构域之间的天然二硫键稳定。可以通过在VH和VL结构域之间引入链间二硫桥进一步稳定包含重链可变区结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的抗原结合部分,如Fab、交叉Fab、scFv和scFab片段。因此,在一个实施方案中,可以通过插入半胱氨酸残基产生链间二硫键(例如,可变重链的位置44和可变轻链的位置100,根据Kabat编号)来进一步稳定根据本发明的抗原结合受体中包含的Fab片段、交叉Fab片段、scFv片段和/或scFab片段。在所附实施例和附图中通过术语“ds”来提及这样稳定的抗原结合部分。

[0243] 锚定跨膜结构域

[0244] 在本发明的内容中,本发明的抗原结合受体的锚定跨膜结构域可以特征在于不具有哺乳动物蛋白酶的切割位点。在本发明的内容中,蛋白酶是指能够水解包含该蛋白酶的切割位点的跨膜结构域的氨基酸序列的蛋白水解酶。术语蛋白酶包括内肽酶和外肽酶。在本发明的内容中,通过例如CD-命名法规定的任何跨膜蛋白锚定跨膜结构域均可以用于产生本发明的抗原结合受体,其在结合如本文所定义的突变Fc结构域时,激活T细胞,优选CD8+T细胞。

[0245] 因此,在本发明的内容中,锚定跨膜结构域可以包含鼠源/小鼠或优选人的跨膜结构域的一部分。这样的锚定跨膜结构域的实例是CD28的跨膜结构域,例如,具有本文SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列(由SEQ ID NO:24中所示的DNA序列编码)。在本发明的内容中,本发明的抗原结合受体的跨膜结构域可以包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列组成(由SEQ ID NO:24中所示的DNA序列编码)。

[0246] 在本发明的举例说明性实施方案中,作为概念的证明,提供了抗原结合受体,所述抗原结合受体包含:包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列(由SEQ ID NO:22中所示的DNA序列编码)的抗原结合部分,和SEQ ID NO:71所示的CD28的片段/多肽部分(人CD28的Uniprot Entry号是P10747(版本号173和序列的版本1))(由SEQ ID NO:70中所示的DNA序列编码)。或者,通过例如CD命名法提供的,具有跨膜结构域的任何蛋白均可以用作本发明的抗原结合受体蛋白的锚定跨膜结构域。如上所述,本文提供的抗原结合受体可以包含CD28的锚定跨膜结构域,其位于SEQ ID NO:71中所示的人全长CD28蛋白(由SEQ ID NO:70中所示的cDNA编码)的氨基酸153至179、154至179、155至179、156至179、157至179、158至179、159至179、160至179、161至179、162至179、163至179、164至179、165至179、166至179、167至179、168至179、169至179、170至179、171至179、172至179、173至179、174至179、175至179、176至179、177至179,或178至179。因此,在本发明的内容中,锚定跨膜结构域可以包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列组成(通过SEQ ID NO:24中所示的DNA序列编码)。

[0247] 在一个实施方案中,提供了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含

[0248] (a) 在C-末端,任选通过SEQ ID NO:17的肽接头,与SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域的N-末端融合的、包含SEQ ID NO:64氨基酸序列的重链;和

[0249] (b) 包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的轻链。

[0250] 在一个实施方案中,提供了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含

[0251] (a) 在C-末端,任选通过SEQ ID NO:17的肽接头,与SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域的N-末端融合的、包含选自SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链;和

[0252] (b) 包含选自SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:50的氨基酸序列的轻链。

[0253] 在一个实施方案中,提供了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含

[0254] (a) 在C-末端,任选通过SEQ ID NO:17的肽接头,与SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域的N-末端融合的、包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的重链;和

[0255] (b) 包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的轻链。

[0256] 在一个优选实施方案中,提供了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含

[0257] (a) 在C-末端,任选通过SEQ ID NO:17的肽接头,与SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域的N-末端融合的、包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链;和

[0258] (b) 包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的轻链。

[0259] 在一个实施方案中,提供了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv片段,其中抗原结合受体包含在C-末端任选通过SEQ ID NO:17的肽接头与SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域的N-末端融合的SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0260] 在一个实施方案中,提供了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv片段,其中抗原结合受体包含在C-末端任选通过SEQ ID NO:17的肽接头与SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域的N-末端融合的选自SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0261] 在一个实施方案中,提供了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv片段,其中抗原结合受体包含在C-末端任选通过SEQ ID NO:17的肽接头与SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域的N-末端融合的SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0262] 在一个实施方案中,提供了包含锚定跨膜结构域和胞外结构域的抗原结合受体,胞外结构域包含能够特异性结合包含P329G突变的Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFab片段,其中scFv片段包含在C-末端任选通过SEQ ID NO:17的肽接头与SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域的N-末端融合的SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0263] 刺激信号传导结构域(SSD)和共刺激信号传导结构域(CSD)

[0264] 优选,本发明的抗原结合受体包含至少一个刺激信号传导结构域和/或至少一个共刺激信号结构域。因此,本文提供的抗原结合受体优选包含刺激信号传导结构域,其提供

T细胞激活。本文提供的抗原结合受体可以包含刺激信号传导结构域,其是鼠源/小鼠或人的CD3z(人CD3z的UniProt Entry是P20963(版本号177,序列号2;鼠源/小鼠CD3z的UniProt Entry是P24161(主要可引用登录号)或Q9D3G3(次要可引用登录号),版本号143,和序列号1))、FCGR3A(人FCGR3A的UniProt Entry是P08637(版本号178,序列号2))或NKG2D(人NKG2D的UniProt Entry是P26718(版本号151,序列号1);鼠源/小鼠NKG2D的UniProt Entry是054709(版本号132,序列号2))的片段/多肽部分。

[0265] 因此,包含在本文提供的抗原结合受体中的刺激信号传导结构域可以是全长CD3z、FCGR3A或NKG2D的片段/多肽部分。鼠源/小鼠全长CD3z或NKG2D的氨基酸序列在本文显示为SEQ ID NO:96(CD3z)、100(FCGR3A)或104(NKG2D)(鼠源/小鼠,由SEQ ID NO:97(CD3z)、101(FCGR3A)或105(NKG2D)中所示的DNA序列编码)。人全长CD3z、FCGR3A或NKG2D的氨基酸序列在本文显示为SEQ ID NO:94(CD3z)、98(FCGR3A)或102(NKG2D)(人,由SEQ ID NO:95(CD3z)、99(FCGR3A)或103(NKG2D)中所示的DNA序列编码)。本发明的抗原结合受体可以包含CD3z、FCGR3A或NKG2D的片段作为刺激结构域,条件是其包含至少一个信号传导结构域。特别地,CD3z、FCGR3A或NKG2D的任何部分/片段作为刺激结构域是合适的,只要其包含至少一个信号传导motive。然而,更优选,本发明的抗原结合受体包含源自人来源的多肽。因此,更优选,本文提供的抗原结合受体包含本文显示为SEQ ID NO:94(CD3z)、98(FCGR3A)或102(NKG2D)的氨基酸序列(人,由SEQ ID NO:95(CD3z)、99(FCGR3A)或103(NKG2D)中所示的DNA序列编码)。例如,可以包含在本发明的抗原结合受体中的人CD3z的片段/多肽部分可以包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列组成(由SEQ ID NO:26中所示的DNA序列编码)。因此,在一个实施方案中,抗原结合受体包含SEQ ID NO:13中所示的序列或与SEQ ID NO:13相比具有多达1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29或30个取代、缺失或插入且特征在于具有刺激信号传导活性的序列。在下文以及实施例和附图中,提供了包含刺激信号传导结构域(SSD)的抗原结合受体的具体构造。例如,可以通过增强的细胞因子释放(如通过ELISA测量的(IL-2、IFN γ 、TNF α))、增强的增殖活性(如通过增加的细胞数测量的),或增强的裂解活性(如通过LDH释放测定法测量的),来确定刺激信号传导活性。

[0266] 此外,本文提供的抗原结合受体优选包含至少一个共刺激信号传导结构域,其向T细胞提供另外的活性。本文提供的抗原结合受体可以包含共刺激信号传导结构域,其是鼠源/小鼠或人CD28(人CD28的UniPort Entry是P10747(版本号173,序列号1);鼠源/小鼠CD28的UniPort Entry是P31041(版本号134,序列号2))、CD137(人CD137的UniPort Entry是Q07011(版本号145,序列号1);鼠源/小鼠CD137的UniProt Entry是P20334(版本号139,序列号1))、OX40(人OX40的UniPort Entry是P23510(版本号138,序列号1);鼠源/小鼠OX40的UniPort Entry是P43488(版本号119,序列号1))、ICOS(人ICOS的UniPort Entry是Q9Y6W8(版本号126,序列号1));鼠源/小鼠ICOS的UniPort Entry是Q9WV40(主要可引用登录号)或Q9JL17(次要可引用登录号),版本号102和序列版本2)、CD27(人CD27的UniPort Entry是P26842(版本号160,序列号2);鼠源/小鼠CD27的UniPort Entry是P41272(版本号137,序列版本1))、4-1-BB(鼠源/小鼠4-1-BB的UniPort Entry是P20334(版本号140,序列版本1);人4-1-BB的UniPort Entry是Q07011(版本号146,序列版本))、DAP109(人DAP10的UniPort Entry是Q9UBJ5(版本号25,序列号1);鼠源/小鼠DAP109的UniPort Entry是

Q9QUJ0(主要可引用登录号)或Q9R1E7(次要可引用登录号),版本号101和序列号1))或DAP12(人DAP12的UniPort Entry是043914(版本号146和序列号1);鼠源/小鼠DAP12的UniPort Entry是0054885(主要可引用登录号)或Q9R1E7(次要可引用登录号),版本号123和序列号1)的片段/多肽部分。在本发明的某些实施方案中,本发明的抗原结合受体可以包含一个或多个,即,1、2、3、4、5、6或7个本文定义的共刺激信号传导结构域。因此,在本发明的内容中,本发明的抗原结合受体可以包含鼠源/小鼠或优选人CD28的片段/多肽部分作为第一共刺激信号传导结构域,并且第二共刺激信号传导结构域选自鼠源/小鼠或优选人CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10和DAP12,或其片段。优选,本发明的抗原结合受体包含源自人来源的共刺激信号传导结构域。因此,更优选,包含在本发明的抗原结合受体中的共刺激信号传导结构域可以包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列组成(由SEQ ID NO:25中所示的DNA序列编码)。

[0267] 因此,可以任选包含在本文提供的抗原结合受体中的共刺激信号传导结构域可以是全长CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10和DAP12的片段/多肽部分。鼠源/小鼠全长CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、CD27、DAP10和DAP12的氨基酸序列在本文显示为SEQ ID NO:69(CD27)、73(CD28)、77(CD137)、81(OX40)、85(ICOS)、89(DAP10)或93(DAP12)(鼠源/小鼠,由SEQ ID NO:68(CD27)、72(CD28)、76(CD137)、80(OX40)、84(ICOS)、88(DAP10)或92(DAP12)中所示的DNA序列编码)。然而,因为在本发明的内容中,人序列最优先,因此可以任选包含在本文提供的抗原结合受体蛋白中的共刺激信号传导结构域可以是人全长CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12的片段/多肽部分。人全长CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10和DAP12的氨基酸序列在本文显示为SEQ ID NO:67(CD27)、71(CD28)、75(CD137)、79(OX40)、83(ICOS)、87(DAP10)或91(DAP12)(人,由SEQ ID NO:66(CD27)、70(CD28)、74(CD137)、78(OX40)、82(ICOS)、86(DAP10)或90(DAP12)中所示的DNA序列编码)。

[0268] 在一个优选实施方案中,抗原结合受体包含CD28或其片段作为共刺激信号传导结构域。本文提供的抗原结合受体可以包含CD28的片段作为共刺激信号传导结构域,只要包含至少一个CD28的信号传导结构域。特别地,CD28的任何部分/片段适用于本发明的抗原结合受体,只要包含CD28的至少一个信号传导基序。例如,包含在本发明的抗原结合受体蛋白中的CD28多肽可以包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列组成(由SEQ ID NO:25中所示的序列编码)。在本发明中,作为共刺激信号传导结构域发挥作用的所述CD28的胞内结构域,可以包含源自CD28多肽的胞内结构域的序列,具有序列YMNM(SEQ ID NO:106)和/或PYAP(SEQ ID NO:107)。优选,本发明的抗原结合受体包含源自人来源的多肽。例如,可以包含在本发明的抗原结合受体中的人CD28的片段/多肽部分可以包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列组成(由SEQ ID NO:25中所示的DNA序列编码)。因此,在本发明的内容中,抗原结合受体包含SEQ ID NO:12中所示的序列或与SEQ ID NO:12相比具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个取代、缺失或插入并且特征在于具有共刺激信号传导活性的序列。在下文以及实施例和附图中,提供了包含共刺激信号传导结构域(CSD)的抗原结合受体的具体构造。可以通过例如,增强的细胞因子释放(如通过ELISA测量的(IL-2、IFN γ 、TNF α))、增强的增殖活性(如通过增加的细胞数测量的),或增强的裂解活性(如通过LDH释放测定法测量的),来测定共刺激信号传导活性。

[0269] 如上所述,在本发明的一个实施方案中,抗原结合受体的共刺激信号传导结构域可以源自人CD28基因(Uni Prot Entry No:P10747(登录号,登录版本:173和序列版本1))并提供CD28活性,定义为本文所述的转导细胞(如转导的T细胞)的细胞因子产生、增殖和裂解活性。可以通过如下方式来测量CD28活性:通过ELISA或流式细胞术测量细胞因子的释放(细胞因子如干扰素- γ (IFN- γ)或白介素2(IL-2))、通过例如ki67-测量来测定T细胞增殖、通过流式细胞术进行细胞定量、或通过靶细胞的实时阻抗测量来测定裂解活性(使用例如ICELLelligence仪器,如,例如,Thakur等,Biosens Bioelectron.35(1)(2012),503-506;Krutzik等,Methods Mol Biol.699(2011),179-202;Ekkens等,Infect Immun.75(5)(2007),2291-2296;Ge等,Proc Natl Acad Sci U S A.99(5)(2002),2983-2988;Düwell等,Cell Death Differ.21(12)(2014),1825-1837,Erratum,Cell Death Differ.21(12)(2014),161中所述的)。共刺激信号传导结构域PYAP(SEQ ID NO:107的AA208至211)和YMNM(SEQ ID NO:106的AA191至194)对于CD28多肽的功能和上面所列的功能效应是有益的。YMNM结构域的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:106中;PYAP结构域的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:107中。因此,在本发明的抗原结合受体中,CD28多肽优选包含源自具有序列YMNM(SEQ ID NO:106)和/或PYAP(SEQ ID NO:107)的CD28多肽的胞内结构域的序列。在本发明的内容中,具有序列YMNM(SEQ ID NO:106)和/或PYAP(SEQ ID NO:107)的CD28多肽的胞内结构域的特征在于CD28活性,定义为本文所述的转导细胞(例如,转导的T细胞)的细胞因子产生、增殖和裂解活性。因此,在本发明的内容中,本发明的抗原结合受体的共刺激信号结构域具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列(人)(由SEQ ID NO:25中所示的DNA序列编码)。然而,在本发明的抗原结合受体中,这些结构域中的一个或两个可以分别突变成FMNM(SEQ ID NO:108)和/或AYAA(SEQ ID NO:109)。这些突变中的任一个,可以降低包含抗原结合受体的转导细胞释放细胞因子的能力但不影响其增殖的能力,并且可以有利地用于延长转导细胞的生存力并且因此延长转导细胞的治疗潜能。或,换句话说,这样的非功能突变优选可以增强用本文提供的抗原结合受体转导的细胞在体内的持久性。然而,这些信号传导基序可以存在于本文提供的抗原结合受体的胞内结构域内的任何位点。

[0270] 接头和信号肽

[0271] 此外,本文提供的抗原结合受体可以包含至少一个接头(或“间隔物”)。接头通常是长度多达20个氨基酸的肽。因此,在本发明的内容中,接头可以具有1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19或20个氨基酸的长度。例如,本文提供的抗原结合受体可以在包含至少一个能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域、锚定跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和/或刺激信号传导结构域之间包含接头。此类接头具有以下优点:它们增加了抗原结合受体的不同多肽(即,包含至少一个能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域、锚定跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和/或刺激信号传导结构域)独立折叠并且按预期表现的可能性。因此,在本发明的内容中,包含至少一个能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域、不具有哺乳动物蛋白酶的切割位点的锚定跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和刺激信号传导结构域可以包含在单链多功能多肽链中。单链融合构建体例如可以由一个或多个多肽组成,所述多肽包含一个或多个含有至少一个能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域、一个或多个锚定跨膜结构域、一个或多个共刺激信号传导结构域和/或一个或多个刺激性信号传

导域。在备选的实施方案中，抗原结合受体包含抗原结合部分，其不是单链融合构建体，即抗原结合部分是Fab或交叉Fab片段。在这样的实施方案中，抗原结合受体不是仅包含一条多肽链的单链融合构建体。优选，此类构建体将包含与本文所述的免疫球蛋白轻链组合的单链重链融合多肽，例如，重链融合多肽可以包含一个或多个免疫球蛋白重链、一个或多个锚定跨膜结构域、一个或多个共刺激信号传导结构域和/或一个或多个刺激信号传导结构域，并与一个或多个免疫球蛋白轻链组合。因此，抗原结合部分、锚定跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和刺激信号传导结构域可以通过如本文所述的一个或多个相同或不同的肽接头连接。例如，在本文提供的抗原结合受体中，包含至少一个能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域和锚定跨膜结构域之间的接头可以包含如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列或由其组成。因此，锚定跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和/或刺激结构域可以通过肽接头彼此连接，或者通过结构域的直接融合彼此连接。

[0272] 在根据本发明的一些实施方案中，胞外结构域中包含的抗原结合部分是单链可变片段(scFv)，其是用10至约25个氨基酸的短接头肽连接的抗体重链(VH)和轻链(VL)可变区的融合蛋白。为了灵活性，接头通常富含甘氨酸，以及为了溶解性，富含丝氨酸或苏氨酸，并且可以将VH的N-末端连接VL的C-末端，或反之亦然。例如，在本文提供的抗原结合受体中，接头可以具有如SEQ ID NO:16中所示的氨基和氨基酸序列。本文所述的scFv抗原结合部分保留初始抗体的特异性，尽管去除了恒定区并引入了接头。scFv抗体例如描述于Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96)。

[0273] 在根据本发明的一些实施方案中，胞外结构域中包含的抗原结合部分是单链Fab片段或scFab，其是由重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和接头组成的多肽，其中所述抗体结构域和所述接头具有以下以N-末端到C-末端方向的顺序之一：a) VH-CH1-接头-VL-CL, b) VL-CL-接头-VH-CH1, c) VH-CL-接头-VL-CH1或d) VL-CH1-接头-VH-CL；其中所述接头是至少30个氨基酸的多肽，优选32至50个氨基酸。所述单链Fab片段通过CL结构域和CH1结构域之间的天然二硫键稳定。

[0274] 在根据本发明的一些实施方案中，胞外结构域中包含的抗原结合部分是交叉单链Fab片段，其是由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和接头组成的多肽，其中所述抗体结构域和所述接头具有以下以N-末端至C-末端方向的顺序之一：a) VH-CL-接头-VL-CH1和b) VL-CH1-接头-VH-CL；其中VH和VL一起形成抗原结合位点，其特异地结合抗原，并且其中所述接头是至少30个氨基酸的多肽。本文提供的抗原结合受体或其部分可以包含信号肽。这样的信号肽将蛋白质带至T细胞膜的表面。例如，在本文提供的抗原结合受体中，信号肽可以具有如SEQ ID NO:110中所示的氨基和氨基酸序列(由SEQ ID NO:111中所示的DNA序列编码)。

[0275] 能够特异性结合突变Fc结构域的T细胞激活性抗原结合受体

[0276] 如本文所述的抗原结合受体的组分可以以各种构型彼此融合，以产生T细胞激活性抗原结合受体。在一些实施方案中，抗原结合受体包含由连接至锚定跨膜结构域的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)组成的胞外结构域。在一些实施方案中，VH结构域在C-末端与VL结构域的N-末端融合，任选通过肽接头。在其他实施方案中，抗原结合受体进一步包含刺激信号传导结构域和/或共刺激信号传导结构域。在特定的这样的实施方案中，抗原结合受体基本上由通过一个或多个肽接头连接的VH结构域和VL结构域、锚定跨膜结构

域和任选刺激信号传导结构域组成,其中VH结构域在C-末端与VL结构域的N-末端融合,并且VL结构域在C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,其中锚定跨膜结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合。任选,抗原结合受体进一步包含共刺激信号传导结构域。在一个这样的特定实施方案中,抗原结合受体基本上由通过一个或多个肽接头连接的VH结构域和VL结构域、锚定跨膜结构域、刺激信号传导结构域和共刺激信号传导结构域组成,其中VH结构域在C-末端与VL结构域的N-末端融合,并且VL结构域在C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,其中锚定跨膜结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合,其中刺激信号传导结构域在C-末端与共刺激信号传导结构域的N-末端融合。在可替换的实施方案中,替代刺激信号传导结构域,共刺激信号传导结构域连接至锚定跨膜结构域。在优选实施方案中,抗原结合受体基本上由通过一个或多个肽接头连接的VH结构域和VL结构域、锚定跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和刺激信号传导结构域组成,其中VH结构域在C-末端与VL结构域的N-末端融合,并且VL结构域在C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,其中锚定跨膜结构域在C-末端与共刺激信号传导结构域的N-末端融合,其中共刺激信号传导结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合。

[0277] 在优选实施方案中,结合部分之一是Fab片段或交叉Fab片段。在一个优选的实施方案中,抗原结合部分在Fab或交叉Fab重链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,任选通过肽接头。在可替换的实施方案中,抗原结合部分在Fab或交叉Fab轻链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,任选通过肽接头。在其他实施方案中,抗原结合受体进一步包含刺激信号传导结构域和/或共刺激信号传导结构域。在具体的这样的实施方案中,抗原结合受体基本上由通过一个或多个肽接头连接的Fab或交叉Fab片段、锚定跨膜结构域和任选的刺激信号传导结构域组成,其中Fab或交叉Fab片段在重链或轻链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,其中锚定跨膜结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合。优选,抗原结合受体进一步包含共刺激信号传导结构域。在一个这样的实施方案中,抗原结合受体基本上由通过一个或多个肽接头连接的Fab或交叉Fab片段、锚定跨膜结构域、刺激信号传导结构域和共刺激信号传导结构域组成,其中Fab或交叉Fab片段在重链或轻链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,其中刺激信号传导结构域在C-末端与共刺激信号传导结构域的N-末端融合。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域连接至锚定跨膜结构域,而非刺激信号传导结构域。在一个最优选的实施方案中,抗原结合受体基本上由Fab或交叉Fab片段、锚定跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和刺激信号传导结构域组成,其中Fab或交叉Fab片段通过肽接头在重链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,其中锚定跨膜结构域在C-末端与共刺激信号传导结构域的N-末端融合,其中共刺激信号传导结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合。

[0278] 抗原结合部分、锚定跨膜结构域和刺激信号传导和/或共刺激信号传导结构域可以彼此直接融合或通过一个或多个肽接头融合,所述肽接头包含一个或多个氨基酸,通常约2-20个氨基酸。肽接头是本领域已知的并在本文中有描述。合适的、非免疫原性的肽接头包括,例如, $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 、 $(G_4S)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽接头,其中“n”通常是1至10的数,通常2至4。用于连接抗原结合部分和锚定跨膜部分的优选肽接头是根据SEQ ID NO:17的GGGGS(G_4S)。适用于连接可变重链(VH)和可变轻链(VL)的示例性肽接头是根据SEQ ID NO:16的GGGSGGGSGGGSGGGGS(G_4S)₄。

[0279] 另外,接头可以包含(一部分)免疫球蛋白铰链区。特别地,在抗原结合部分与锚定跨膜结构域的N-末端融合的情况下,其可以通过免疫球蛋白铰链区或其部分来融合,使用或未用另外的肽接头。

[0280] 如本文所述,本发明的抗原结合受体包含含有至少一个抗原结合部分的胞外结构域。具有能够特异性结合靶细胞抗原的单个抗原结合部分的抗原结合受体是有用的并且是优选的,特别是在其中需要抗原结合受体的高表达的情况下。在这样的情况下,超过一个的靶细胞抗原特异性的抗原结合部分的存在可能限制抗原结合受体的表达效率。然而,在其他情况下,有利的是,具有包含两个或多个靶细胞抗原特异性的抗原结合部分的抗原结合受体,例如,以优化对靶位点的靶向或允许靶细胞抗原交联。

[0281] 在一个特别的实施方案中,抗原结合受体包含一个能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分,特别是包含P329G突变的IgG1 Fc结构域。在一个实施方案中,能够特异性结合突变Fc结构域,但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的抗原结合部分是scFv、Fab或交叉Fab。

[0282] 在一个实施方案中,抗原结合部分在scFv片段的C-末端或在Fab或交叉Fab重链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,任选通过肽接头。在一个实施方案中,肽接头包含氨基酸序列GGGGS (SEQ ID NO:16)。在一个实施方案中,锚定跨膜结构域是选自CD8、CD3z、FCGR3A、NKG2D、CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12跨膜结构域或其片段的跨膜结构域。在优选实施方案中,锚定跨膜结构域是CD28跨膜结构域或其片段。在特别的实施方案中,锚定跨膜结构域包含FWVLVVVGVLACYSLLTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列或由其组成。在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含共刺激信号传导结构域(CSD)。在一个实施方案中,抗原结合受体的锚定跨膜结构域在C-末端与共刺激信号传导结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,共刺激信号传导结构域独立地选自CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10和DAP12的胞内结构域,或其片段,如本文在前面所述的。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD28的胞内结构域或其片段。在特别的实施方案中,共刺激信号传导结构域包含序列RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ PYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:12)或由其组成。在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,抗原结合受体的共刺激信号传导结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,至少一个刺激信号传导结构域独立地选自CD3z、FCGR3A和NKG2D的胞内结构域,或其片段。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD3z的胞内结构域或其片段。在特别的实施方案中,共刺激信号传导结构域包含序列:RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:13),或由其组成。

[0283] 在一个实施方案中,抗原结合受体与报告蛋白融合,特别是与GFP或其增强型类似物融合。在一个实施方案中,抗原结合受体在C-末端与eGFP(增强的绿色荧光蛋白)的N-末端融合,任选通过本文所述的肽接头。在优选实施方案中,肽接头是根据SEQ ID NO:18的GEGRGSLLTCGDVEENPGP (T2A)。

[0284] 在特别的实施方案中,抗原结合受体包含锚定跨膜结构域和含有至少一个抗原结合部分的胞外结构域,其中至少一个抗原结合部分是能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv片段,其中突变Fc结构域包含P329G突变。P329G突

变降低Fc γ 受体结合。在一个实施方案中,本发明的抗原结合受体包含锚定跨膜结构域(ATD)、共刺激信号传导结构域(CSD)和刺激信号传导结构域(SSD)。在一个这样的实施方案中,抗原结合受体具有构造scFv-ATD-CSD-SSD。在优选实施方案中,抗原结合受体具有构造scFv-G₄S-ATD-CSD-SSD,其中G₄S是包含SEQ ID NO:17的序列GGGGS的接头。任选,可以将报告蛋白添加至抗原结合受体的C-末端,任选通过肽接头。

[0285] 在特别的实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含P329突变的突变Fc结构域的scFv片段,其中抗原结合部分包含至少一个选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的重链互补决定区(CDR)和至少一个选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6的轻链CDR。

[0286] 在优选实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含P329突变的突变Fc结构域的scFv片段,其中抗原结合部分包含互补决定区(CDR H)1氨基酸序列RYWMN(SEQ ID NO:1)、CDR H2氨基酸序列EITPDSSTINYTPSLKD(SEQ ID NO:2)、CDR H3氨基酸序列PYDYGAWFAS(SEQ ID NO:3)、轻链互补决定区(CDR L)1氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:4)、CDR L2氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:5)和CDR L3氨基酸序列ALWYSNHWV(SEQ ID NO:6)。

[0287] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0288] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的scFv片段,其中scFv片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区包含SEQ ID NO:1的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ ID NO:3的重链CDR 3,轻链可变区包含SEQ ID NO:4的轻链CDR 1、SEQ ID NO:5的轻链CDR 2和SEQ ID NO:6的轻链CDR 3;

[0289] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0290] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0291] (iv) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0292] (v) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。

[0293] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0294] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的scFv分子,其中scFv包含选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:32的重链可变结构域(VH)以及选自SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:33的轻链可变结构域(VL);

[0295] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0296] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0297] (iv) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0298] (v) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。

[0299] 在优选实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0300] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的scFv分子,其中scFv包含SEQ ID NO:8的重链可变结构域(VH)和SEQ ID NO:9的轻链可变结构域(VL);

[0301] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0302] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0303] (iv) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0304] (v) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。

- [0305] 在优选实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:
- [0306] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的scFv分子,其中scFv包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:34的氨基酸序列;
- [0307] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;
- [0308] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;
- [0309] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和
- [0310] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。
- [0311] 在特别的实施方案中,抗原结合部分能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域,其中抗原结合受体包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。
- [0312] 在优选实施方案中,抗原结合部分能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域,其中抗原结合受体包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。
- [0313] 在优选实施方案中,抗原结合部分是Fab片段。在一个实施方案中,抗原结合部分在Fab重链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,锚定跨膜结构域是选自CD8、CD3z、FCGR3A、NKG2D、CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12跨膜结构域或其片段的跨膜结构域。在优选实施方案中,锚定跨膜结构域是CD28跨膜结构域或其片段。在特别的实施方案中,锚定跨膜结构域是FWVLVVVGVLACYSLLVTVAIFIIFWV (SEQ ID NO:11)。在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含共刺激信号传导结构域(CSD)。在一个实施方案中,抗原结合受体的锚定跨膜结构域在C-末端与共刺激信号传导结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,共刺激信号传导结构域独立地选自CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10和DAP12的胞内结构域,或其片段,如本文在前面所述的。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD28的胞内结构域或其片段。在特别的实施方案中,共刺激信号传导结构域包含序列:RSKRSRLLHSDYMNTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:12),或由其组成。在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,抗原结合受体的共刺激信号传导结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,至少一个刺激信号传导结构域独立选自CD3z、FCGR3A和NKG2D的胞内结构域,或其片段。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD3z的胞内结构域或其片段。在特别的实施方案中,共刺激信号传导结构域包含序列RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:13),或由其组成。
- [0314] 在一个实施方案中,抗原结合受体与报告蛋白融合,特别是与GFP或其增强型类似物融合。在一个实施方案中,抗原结合受体在C-末端与eGFP(增强的绿色荧光蛋白)的N-末端融合,任选通过本文所述的肽接头。在优选实施方案中,肽接头是SEQ ID NO:18的GEGRGSLLTCGDVEENPGP(T2A)。
- [0315] 在特别的实施方案中,抗原结合受体包含锚定跨膜结构域和含有至少一个抗原结合部分的胞外结构域,其中至少一个抗原结合部分是能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的Fab片段,其中突变Fc结构域包含P329G突变,其中P329G突变降低Fc γ 受体结合。在一个实施方案中,本发明的抗原结合受体包含锚定跨膜结构域(ATD)、共刺激信号传导结构域(CSD)和刺激信号结构域(SSD)。在一个这样的实施方案中,

抗原结合受体具有构造Fab-ATD-CSD-SSD。在优选实施方案中,抗原结合受体具有构造Fab-G₄S-ATD-CSD-SSD,其中G₄S是包含SEQ ID NO:17的序列GGGGS的接头。任选,可以将报告蛋白添加至抗原结合受体的C-末端,任选通过肽接头。

[0316] 在特别的实施方案中,抗原结合部分能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域,其中抗原结合部分是包含至少一个选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的重链互补决定区(CDR)和至少一个选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6的轻链CDR的Fab片段。

[0317] 在优选实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合部分包含互补决定区(CDR H)1氨基酸序列RYWMN(SEQ ID NO:1)、CDR H2氨基酸序列EITPDSSTINYTPSLKD(SEQ ID NO:2)、CDR H3氨基酸序列PYDYGAWFAS(SEQ ID NO:3)、轻链互补决定区(CDR L)1氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:4)、CDR L2氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:5)和CDR L3氨基酸序列ALWYSNHWV(SEQ ID NO:6)。

[0318] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0319] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的Fab分子,其包含SEQ ID NO:1的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ ID NO:3的重链CDR 3、SEQ ID NO:4的轻链CDR 1、SEQ ID NO:5的轻链CDR 2和SEQ ID NO:6的轻链CDR 3;

[0320] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0321] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0322] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0323] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。

[0324] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其包含:

[0325] a) 重链融合多肽,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0326] (i) 重链,其包含SEQ ID NO:1的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ ID NO:3的重链CDR3;

[0327] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0328] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0329] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0330] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域;和

[0331] b) 轻链,其包含SEQ ID NO:4的轻链CDR 1、SEQ ID NO:5的轻链CDR 2和SEQ ID NO:6的轻链CDR 3。

[0332] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其包含:

[0333] a) 重链融合多肽,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0334] (i) SEQ ID NO:8的重链可变结构域(VH);

[0335] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0336] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0337] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0338] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域;和

[0339] b) SEQ ID NO:9的轻链可变结构域(VL)。

[0340] 在一个实施方案中,抗原结合部分是包含重链和轻链的Fab片段,重链包含SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:49的氨基酸序列或由其组成,轻链包含SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:50的氨基酸序列或由其组成。在优选实施方案中,抗原结合部分是包含重链和轻链的Fab片段,重链包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列或由其组成,轻链包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列或由其组成。

[0341] 在特别的实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含重链融合多肽和轻链多肽,重链融合多肽包含与选自SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:48的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链多肽包含与选自SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:50的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0342] 在优选实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含重链融合多肽和轻链多肽,重链融合多肽包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列和轻链多肽包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0343] 在可替换的实施方案中,抗原结合受体包含一个能够特异性结合包含突变I253A、H310A和H435A(“AAA”)的突变Fc结构域,特别是IgG1 Fc结构域的抗原结合部分。在一个实施方案中,能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的抗原结合部分是scFv、Fab或交叉Fab。

[0344] 在一个实施方案中,抗原结合部分在scFv片段的C-末端或在Fab或交叉Fab重链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合,任选通过肽接头。在一个实施方案中,肽接头包含氨基酸序列GGGGS (SEQ ID NO:16)。在一个实施方案中,锚定跨膜结构域是选自CD8、CD3z、FCGR3A、NKG2D、CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12跨膜结构域或其片段的跨膜结构域。在优选实施方案中,锚定跨膜结构域是CD28跨膜结构域或其片段。在特别的实施方案中,锚定跨膜结构域包含FWVLVVVGVLACYSLTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11),或由其组成。在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含共刺激信号传导结构域(CSD)。在一个实施方案中,抗原结合受体的锚定跨膜结构域在C-末端与共刺激信号传导结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,共刺激信号传导结构域独立地选自CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10和DAP12的胞内结构域,或其片段,如本文在前面所述的。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD28的胞内结构域或其片段。在特别的实施方案中,共刺激信号传导结构域包含序列:RSKRSRLLHSYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:12),或由其组成。在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,抗原结合受体的共刺激信号传导结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,至少一个刺激信号传导结构域独立地选自CD3z、FCGR3A和NKG2D的胞内结构域,或其片段。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD3z的胞内结构域或其片段。在特别的实施方案中,共刺激信号传导结构域包含序列RVKFSSRADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR (SEQ ID NO:13),或由其组成。

[0345] 在一个实施方案中,抗原结合受体与报告蛋白融合,特别是与GFP或其增强型类似物融合。在一个实施方案中,抗原结合受体在C-末端与eGFP(增强的绿色荧光蛋白)的N-末

端融合,任选通过本文所述的肽接头。在优选实施方案中,肽接头是根据SEQ ID NO:18的GEGRGSLLTCGDVEENPGP(T2A)。

[0346] 在特别的实施方案中,抗原结合受体包含锚定跨膜结构域和含有至少一个抗原结合部分的胞外结构域,其中至少一个抗原结合部分是能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv片段,其中突变Fc结构域包含I253A、H310A和H435A突变。I253A、H310A和H435A突变降低FcRn受体结合。在一个实施方案中,本发明的抗原结合受体包含锚定跨膜结构域(ATD)、共刺激信号传导结构域(CSD)和刺激信号传导结构域(SSD)。在一个这样的实施方案中,抗原结合受体具有构造scFv-ATD-CSD-SSD。在优选实施方案中,抗原结合受体具有构造scFv-G₄S-ATD-CSD-SSD,其中G₄S是包含SEQ ID NO:17的序列GGGGS的接头。任选,可以将报告蛋白添加至抗原结合受体的C-末端,任选通过肽接头。

[0347] 在特别的实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的scFv片段,其中抗原结合部分包含至少一个选自SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55的重链互补决定区(CDR)和至少一个选自SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58的轻链CDR。

[0348] 在优选实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的scFv片段,其中抗原结合部分包含互补决定区(CDR H)1氨基酸序列SYGMS(SEQ ID NO:53)、CDR H2氨基酸序列SSGGSY(SEQ ID NO:54)、CDR H3氨基酸序列LGMITTGYAMDY(SEQ ID NO:55)、轻链互补决定区(CDR L)1氨基酸序列RSSQTIVHSTGHTYLE(SEQ ID NO:56)、CDR L2氨基酸序列KVSNRFS(SEQ ID NO:57)和CDR L3氨基酸序列FQGSHVPYT(SEQ ID NO:58)。

[0349] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0350] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的scFv片段,其中scFv片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区包含SEQ ID NO:53的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:54的重链CDR2、SEQ ID NO:55的重链CDR 3,轻链可变区包含SEQ ID NO:56的轻链CDR 1、SEQ ID NO:57的轻链CDR2和SEQ ID NO:58的轻链CDR 3;

[0351] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0352] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0353] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0354] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。

[0355] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0356] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的scFv分子,其中scFv包含SEQ ID NO:61的重链可变结构域(VH)和SEQ ID NO:62的轻链可变结构域(VL);

[0357] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0358] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0359] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0360] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。

[0361] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0362] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的scFv分子,其中scFv包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;

[0363] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0364] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0365] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0366] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。

[0367] 在特别的实施方案中,抗原结合部分能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域,其中抗原结合受体包含与SEQ ID NO:59的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0368] 在优选实施方案中,抗原结合部分能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域,其中抗原结合受体包含SEQ ID NO:595的氨基酸序列。

[0369] 在优选实施方案中,抗原结合部分是Fab片段。在一个实施方案中,抗原结合部分在Fab重链的C-末端与锚定跨膜结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,锚定跨膜结构域是选自CD8、CD3z、FCGR3A、NKG2D、CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12跨膜结构域或其片段的跨膜结构域。在优选实施方案中,锚定跨膜结构域是CD28跨膜结构域或其片段。在特别的实施方案中,锚定跨膜结构域是FWVLVVVGVLACYSLLVTVAIFIIFWV (SEQ ID NO:11)。在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含共刺激信号传导结构域(CSD)。在一个实施方案中,抗原结合受体的锚定跨膜结构域在C-末端与共刺激信号传导结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,共刺激信号传导结构域独立地选自CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10和DAP12的胞内结构域,或其片段,如本文在前面所述的。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD28的胞内结构域或其片段。在特别的实施方案中,共刺激信号传导结构域包含序列:RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:12),或由其组成。在一个实施方案中,抗原结合受体进一步包含刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,抗原结合受体的共刺激信号传导结构域在C-末端与刺激信号传导结构域的N-末端融合。在一个实施方案中,至少一个刺激信号传导结构域独立地选自CD3z、FCGR3A和NKG2D的胞内结构域或其片段。在优选实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD3z的胞内结构域或其片段。在特别的实施方案中,共刺激信号传导结构域包含序列RVKFSRSADAPAYQQQNQLYN ELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRGKGD GLYQGLSTATK DTYDALHM QALPPR (SEQ ID NO:13),或由其组成。

[0370] 在一个实施方案中,抗原结合受体与报告蛋白融合,特别是与GFP或其增强型类似物融合。在一个实施方案中,抗原结合受体在C-末端与eGFP(增强的绿色荧光蛋白)的N-末端融合,任选通过本文所述的肽接头。在优选实施方案中,肽接头是根据SEQ ID NO:18的GEGRGSLLTCGDVEENPGP (T2A)。

[0371] 在特别的实施方案中,抗原结合受体包含锚定跨膜结构域和含有至少一个抗原结合部分的胞外结构域,其中至少一个抗原结合部分是能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的Fab片段,其中突变Fc结构域包含I253A、H310A和H435A突变,其中I253A、H310A和H435A突变降低FcRn受体结合。在一个实施方案中,本发明的抗原结合受体包含锚定跨膜结构域(ATD)、共刺激信号传导结构域(CSD)和刺激信号传导结构域(SSD)。在一个这样的实施方案中,抗原结合受体具有构造Fab-ATD-CSD-SSD。在优选实施方

案中,抗原结合受体具有构造Fab-G₄S-ATD-CSD-SSD,其中G₄S是包含SEQ ID NO:17的序列GGGGS的接头。任选,可以将报告蛋白添加至抗原结合受体的C-末端,任选通过肽接头。

[0372] 在特别的实施方案中,抗原结合部分能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域,其中抗原结合部分是Fab片段,其包含至少一个选自SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55的重链互补决定区(CDR)和至少一个选自SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58的轻链CDR。

[0373] 在优选实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合部分包含互补决定区(CDR H)1氨基酸序列SYGMS (SEQ ID NO:53)、CDR H2氨基酸序列SSGGSY (SEQ ID NO:54)、CDR H3氨基酸序列LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO:55)、轻链互补决定区(CDR L)1氨基酸序列RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO:56)、CDR L2氨基酸序列KVSNRFS (SEQ ID NO:57)和CDR L3氨基酸序列FQGSHVPYT (SEQ ID NO:58)。

[0374] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0375] (i) 抗原结合部分,其是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的Fab分子,其包含SEQ ID NO:53的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:54的重链CDR2、SEQ ID NO:55的重链CDR 3、SEQ ID NO:56的轻链CDR 1、SEQ ID NO:57的轻链CDR 2和SEQ ID NO:58的轻链CDR 3;

[0376] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0377] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0378] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0379] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域。

[0380] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其包含

[0381] a) 重链融合多肽,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0382] (i) 重链,其包含SEQ ID NO:53的重链互补决定区(CDR)1、SEQ ID NO:54的重链CDR2、SEQ ID NO:55的重链CDR 3;

[0383] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0384] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0385] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0386] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域,和

[0387] b) 轻链,其包含SEQ ID NO:56的轻链CDR 1、SEQ ID NO:57的轻链CDR 2和SEQ ID NO:58的轻链CDR 3。

[0388] 在一个实施方案中,本发明提供了抗原结合受体,其包含

[0389] a) 重链融合多肽,其从N-末端至C-末端顺序包含:

[0390] (i) SEQ ID NO:61的重链可变结构域(VH);

[0391] (ii) 肽接头,特别是SEQ ID NO:17的肽接头;

[0392] (iii) 锚定跨膜结构域,特别是SEQ ID NO:11的锚定跨膜结构域;

[0393] (iii) 共刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:12的共刺激信号传导结构域;和

[0394] (iv) 刺激信号传导结构域,特别是SEQ ID NO:13的刺激信号传导结构域,和

[0395] b) SEQ ID NO:62的轻链可变结构域(VL)。

[0396] 在一个特别的实施方案中,抗原结合部分是包含重链和轻链的Fab片段,重链包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列或由其组成,轻链包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列或由其组成。

[0397] 在特别的实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含重链融合多肽和轻链多肽,重链融合多肽包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链多肽包含与SEQ ID NO:65的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0398] 在优选实施方案中,抗原结合部分是能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A突变的突变Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含重链融合多肽和轻链多肽,重链融合多肽包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,轻链多肽包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列。

[0399] 在某些可替换的实施方案中,本发明的抗原结合受体、Fab轻链多肽和Fab重链融合多肽彼此融合,任选通过接头肽融合。Fab重链和轻链的融合可以提高Fab重链和轻链的配对,并且还可以降低本发明的一些抗原结合受体表达所需的质粒数量。降低抗原结合受体表达所需的质粒数量的一个可替换策略是,使用内部核糖体进入位点,使得重链和轻链构建体两者能够从同一质粒表达,例如图2中所示的。

[0400] 在某些实施方案中,抗原结合受体包含其中抗原结合部分的Fab轻链可变区与抗原结合部分的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(即,抗原结合部分包含交叉Fab重链,其中重链可变区被轻链可变区替代),其中重链恒定区继而与锚定跨膜结构域共享羧基末端肽键(VL₍₁₎-CH1₍₁₎-ATD)。在一些实施方案中,抗原结合受体进一步包含其中第一抗原结合部分的Fab重链可变区与第一抗原结合部分的Fab轻链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VH₍₁₎-CL₍₁₎)。在某些实施方案中,多肽是共价连接的,例如,通过二硫键。在可替换的实施方案中,抗原结合受体包含其中抗原结合部分的Fab重链可变区与抗原结合部分的Fab轻链恒定区共享羧基肽键的多肽(即,抗原结合部分包含交叉Fab重链,其中重链恒定区被轻链恒定区替代),其中轻链恒定区继而与锚定跨膜结构域共享羧基末端肽键(VH₍₁₎-CL1₍₁₎-ATD)。在一些实施方案中,抗原结合受体进一步包含其中抗原结合部分的Fab轻链可变区与抗原结合部分的Fab重链恒定区共享羧基末端肽键的多肽(VL₍₁₎-CH1₍₁₎)。在某些实施方案中,多肽是共价连接的,例如,通过二硫键。

[0401] 根据以上任一个实施方案,抗原结合受体的组分(例如,VH和VL、抗原结合部分、锚定跨膜结构域、共刺激信号传导结构域、刺激信号传导结构域)可以直接融合或通过各种接头融合,特别是包含一个或多个氨基酸的肽接头,通常约2-20个氨基酸,如本文所述的或本领域已知的。合适的、非免疫原性的肽接头包括,例如,(G₄S)_n、(SG₄)_n、(G₄S)_n或G₄(SG₄)_n肽接头,其中n通常是1至10的数字,优选1至4。

[0402] 示例性T细胞激活性抗原结合受体

[0403] 如所附实施例和图1A中举例说明性地显示的,作为本发明概念的证明,构建了抗原结合受体“抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17096”(SEQ ID NO:7),其包含一个稳定化scFv抗原结合部分,所述抗原结合部分与在Fc结构域中包含P329G突变的抗体结合/针对在Fc结构域中包含P329G突变的抗体/与在Fc结构域中包含P329G突变的抗体相互作用或作用于在Fc结构域中包含P329G突变的抗体。该构建体进一步包含作为共

刺激信号传导结构域的CD28跨膜结构域(CD28的片段)和作为刺激信号传导结构域的CD3z的片段。抗原结合受体“抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17096”的序列(氨基酸和DNA)显示于表2和3中。

[0404] 此外,如图1B中举例说明的,作为本发明概念的进一步证明,构建了抗原结合受体“抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17100”(SEQ ID NO:39,41),其包含一个稳定化Fab抗原结合部分,所述抗原结合部分结合在Fc结构域中包含P329G突变的抗体/针对在Fc结构域中包含P329G突变的抗体/与在Fc结构域中包含P329G突变的抗体相互作用或作用于在Fc结构域中包含P329G突变的抗体。该构建体进一步包含作为共刺激信号传导结构域的CD28跨膜结构域(CD28的片段)和作为刺激信号传导结构域的CD3z的片段。抗原结合受体“抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17100”的序列(氨基酸和DNA)显示于表4和5中。

[0405] 作为本发明概念的进一步证明,构建了抗原结合受体“抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17594”(SEQ ID NO:48,50),其包含一个Fab抗原结合部分,所述抗原结合部分结合在Fc结构域中包含P329G突变的抗体/针对在Fc结构域中包含P329G突变的抗体/与在Fc结构域中包含P329G突变的抗体相互作用或作用于在Fc结构域中包含P329G突变的抗体。该构建体进一步包含作为共刺激信号传导结构域的CD28跨膜结构域(CD28的片段)和作为刺激信号传导结构域的CD3z的片段。抗原结合受体“抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17594”的序列(氨基酸和DNA)显示于表6和7中。

[0406] 作为本发明概念的进一步证明,构建了抗原结合受体“抗-AAA scFv”(SEQ ID NO:59),其包含一个scFv抗原结合部分,其中所述抗原结合部分结合在Fc结构域中包含I253A、H310A和H435A突变的抗体/针对在Fc结构域中包含I253A、H310A和H435A突变的抗体/与在Fc结构域中包含I253A、H310A和H435A突变的抗体相互作用或作用于在Fc结构域中包含I253A、H310A和H435A突变的抗体。该构建体进一步包含作为共刺激信号传导结构域的CD28跨膜结构域(CD28的片段)和作为刺激信号传导结构域的CD3z的片段。抗体结合分子“抗-AAA scFv”的序列(氨基酸和cDNA)显示于表8和9中。

[0407] 作为本发明概念的进一步证明,构建了抗原结合受体“抗-AAA Fab”(SEQ ID NO:63,65),其包含一个Fab抗原结合部分,其中所述抗原结合部分结合在Fc结构域中包含I253A、H310A和H435A突变的抗体/针对在Fc结构域中包含I253A、H310A和H435A突变的抗体/与在Fc结构域中包含I253A、H310A和H435A突变的抗体相互作用或作用于在Fc结构域中包含I253A、H310A和H435A突变的抗体。该构建体进一步包含作为共刺激信号传导结构域的CD28跨膜结构域(CD28的片段)和作为刺激信号传导结构域的CD3z的片段。抗体结合分子“抗-AAA scFv”的序列(氨基酸和cDNA)显示于表10和11中。

[0408] 本发明还提供了编码如本文所述的本发明的抗原结合受体的核酸分子(一个或多个)。本发明还包括编码本发明的抗原结合受体的核酸分子(一个或多个)和包含根据本发明的核酸分子(一个或多个)的试剂盒,如本文进一步描述的。

[0409] 试剂盒

[0410] 本发明的再一个方面是包含编码本发明的抗原结合受体的核酸和/或细胞(优选用本发明的抗原结合受体转导的T细胞)和任选地包含突变Fc结构域的一个抗体/多个抗体的试剂盒,或由上述成分组成的试剂盒,其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域。

[0411] 因此,提供了试剂盒,其包含

[0412] (A)能够表达本发明的抗原结合受体的转导T细胞;和

[0413] (B)包含突变Fc结构域的抗体;

[0414] 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0415] 进一步提供了试剂盒,其包含

[0416] (A)编码本发明的抗原结合受体的分离多核苷酸和/或载体;和

[0417] (B)包含突变Fc结构域的抗体;

[0418] 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0419] 在本发明的内容中,本发明的试剂盒可以包含转导的T细胞、分离的多核苷酸和/或载体以及一个或多个包含突变Fc结构域的抗体。在特别的实施方案中,抗体是治疗抗体,例如,肿瘤特异性抗体。肿瘤特异性抗体是本领域已知的并且描述于本文中。在本发明的内容中,在施用表达本发明的抗原结合受体的转导T细胞之前、同时或之后施用抗体。根据本发明的试剂盒包含转导的T细胞或多核苷酸/载体以产生转导的T细胞。在此,转导的T细胞是通用T细胞,因为它们不是特异于给定肿瘤的,而是可以根据包含突变Fc结构域的治疗抗体而靶向任何肿瘤。本文提供了包含突变Fc结构域的抗体的实例,然而,任何包含本文所述的突变Fc结构域的抗体可以包括在本文提供的试剂盒中。在特别的实施方案中,抗体的突变Fc结构域呈现出降低的对Fc受体的结合亲和性和/或降低的效应子功能,如与天然IgG₁ Fc结构域相比。在一个这样的实施方案中,突变Fc结构域(或包含所述Fc突变结构域的抗体),与天然IgG₁ Fc结构域(或包含天然IgG₁ Fc结构域的抗体)相比,呈现出低于50%,优选低于20%,更优选低于10%和最优选低于5%的Fc受体结合亲和性,和/或与天然IgG₁ Fc结构域(或包含天然IgG₁ Fc结构域的抗体)相比,低于50%,优选低于20%,更优选低于10%和最优选低于5%的效应子功能。在一个实施方案中,突变Fc结构域(或包含所述突变Fc结构域的抗体)基本上不结合Fc受体和/或诱导效应子功能。在特别的实施方案中,Fc受体是Fc γ受体。在一个实施方案中,Fc受体是人Fc受体。在一个实施方案中,Fc受体是激活性Fc受体。在特定的实施方案中,Fc受体是激活性人Fc γ受体,更特别是人Fc γ IIIa、Fc γ R1或Fc γ RIIa,最特别为人Fc γ RIIIa。在一个实施方案中,效应子功能是选自CDC、ADCC、ADCP和细胞因子分泌中的一种或多种。在特别的实施方案中,效应子功能是ADCC。在一个实施方案中,突变Fc结构域呈现出实质性改变的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和性,如与天然IgG₁ Fc结构域相比。在一个实施方案中,包含突变Fc结构域的抗体呈现出低于20%,特别是低于10%,更特别是低于5%的对Fc受体的结合亲和性,如与包含未工程化的Fc结构域的抗体相比。在特别的实施方案中,Fc受体是Fc γ受体。在一些实施方案中,Fc受体是人Fc受体。在一些实施方案中,Fc受体是激活性Fc受体。在特定的实施方案中,Fc受体是激活性人Fc γ受体,更特别是人Fc γ IIIa、Fc γ R1或Fc γ RIIa,最特别为人Fc γ RIIIa。优选,降低与这些受体中的每一种的结合。在一些实施方案中,与补体成分的结合亲和性,尤其是与C1q的结合亲和性,也降低。

[0420] 在某些实施方案中,突变抗体的Fc结构域,以便与未突变Fc结构域相比,具有降低的效应子功能。降低的效应子功能可以包括,但不限于,以下的一种或多种:降低的补体依

赖性细胞毒性(CDC)、降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、降低的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、降低的细胞因子分泌、降低的由免疫复合物介导的抗原递呈细胞对抗原的摄取、降低的与NK细胞的结合、降低的与巨噬细胞的结合、降低的与单核细胞的结合、降低的与多形核细胞的结合、降低的直接信号传导诱导凋亡、降低的靶结合抗体的交联、降低的树突细胞成熟、或降低的T细胞启动(priming)。在一个实施方案中，降低的效应子功能是选自降低的CDC、降低的ADCC、降低的ADCP和降低的细胞因子分泌中的一种或多种。在一个实施方案中，降低的效应子功能是降低的ADCC。在一个实施方案中，降低的ADCC是未工程化的Fc结构域(或包含未工程化Fc结构域的抗体)诱导的ADCC的20%以下。

[0421] 在一个实施方案中，降低Fc结构域与Fc受体的结合亲和性和/或效应子功能的氨基酸突变是氨基酸置换。在一个实施方案中，Fc结构域在选自E233、L234、L235、N297、P331和P329的位置包含氨基酸置换。在一个更特别的实施方案中，Fc结构域在选自L234、L235和P329的位置包含氨基酸置换。在一些实施方案中，Fc结构域包含氨基酸置换L234A和L235A。在一个这样的实施方案中，Fc结构域是IgG₁ Fc结构域，特别是人IgG₁ Fc结构域。在一个实施方案中，Fc结构域在位置P329包含氨基酸置换。在更特别的实施方案中，氨基酸置换是P329A或P329G，特别是P329G。在一个实施方案中，Fc结构域在位置P329包含氨基酸置换以及在选自E233、L234、L235、N297和P331的位置包含其它氨基酸置换。在更特别的实施方案中，所述其它氨基酸置换是E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在特别的实施方案中，Fc结构域在位置P329、L234和L235包含氨基酸置换。在一个实施方案中，Fc结构域包含氨基酸突变L234A、L235A和P329G (“P329G LALA”)。在一个这样的实施方案中，Fc结构域是IgG₁ Fc结构域，特别是人IgG₁ Fc结构域。氨基酸置换的“P329G LALA”组合几乎完全消除了人IgG₁ Fc结构域的Fc γ受体(以及补体)结合，如PCT公开No. 2012/130831中所述的，所述文献以其整体按引用并入本文中。WO 2012/130831还描述制备这样的突变Fc结构域的方法和测定其特性，如Fc受体结合或效应子功能的方法。

[0422] 在特别的实施方案中，与天然IgG₁ Fc结构域相比，呈现出降低的与Fc受体的结合亲和性和/或降低的效应子功能的Fc结构域，是包含氨基酸突变L234A、L235A和任选P329G的人IgG₁ Fc结构域，或包含氨基酸突变S228P、L235E和任选P329G的人IgG₄ Fc结构域。

[0423] 在某些实施方案中，已经消除了Fc结构域的N-糖基化。在一个这样的实施方案中，Fc结构域在位置N297包含氨基酸突变，特别是天冬酰胺被丙氨酸(N297A)或天冬氨酸(N297D)替代的氨基酸突变。除了以上和PCT公布WO 2012/130831中描述的Fc结构域，具有降低的Fc受体结合和/或效应子功能的Fc结构域还包括Fc结构域残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个具有突变的那些(美国专利No. 6,737,056)。这样的Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或多个具有突变的Fc突变体，包括残基265和297突变成丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利No. 7,332,581)。

[0424] 可以使用本领域公知的遗传或化学方法，通过氨基酸缺失、置换、插入或修饰，来制备突变Fc结构域。遗传方法可以包括编码DNA序列的位点特异性诱变、PCR、基因合成等。例如，可以通过测序，验证正确的核苷酸改变。

[0425] 与Fc受体的结合，例如，可以通过ELISA，或使用标准仪器如BIAcore仪器(GE Healthcare)通过表面等离子体共振(SPR)，来容易地测定，并且可以通过重组表达获得Fc受体。或者，可以使用已知表达特定Fc受体的细胞系，如表达Fc γ IIIa受体的NK细胞，来

评价Fc结构域或包含Fc结构域的细胞激活性双特异性抗原结合分子对Fc受体的结合亲和性。

[0426] 可以通过本领域已知的方法来测量Fc结构域或包含Fc结构域的抗体的效应子功能。评价目标分子的ADCC活性的体外测定法的其他实例描述于美国专利No.5,50,362; Hellstrom等,Proc Natl Acad Sci USA 83,7059-7063(1986) 和Hellstrom等,Proc Natl Acad Sci USA 82,1499-1502(1985); 美国专利No.5,821,337; Bruggemann等,J Exp Med 166,1351-1361(1987)。或者,可以使用非放射性测定法(参见,例如,用于流式细胞术的ACTITM非放射性细胞毒性测定(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 和CytoTox96[®]非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI))。用于这些测定的有用效应子细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替换地,或另外地,体内评价目标分子的ADCC活性,如在动物模型中,参见例如Clynes等,Proc Natl Acad Sci USA 95,652-656(1998)。

[0427] 在一些实施方案中,Fc结构域与补体成分的结合,尤其是与C1q的结合,降低。因此,在一些实施方案中,其中将Fc结构域工程化以具有降低的效应子功能,所述降低的效应子功能包括降低的CDC。可以进行C1q结合测定,以测定抗体是否能够结合C1q,并且是否因此具有CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评价补体激活,可以进行CDC测定(参见,例如,Gazzano-Santoro等,J Immunol Methods 202,163(1996); Cragg等,Blood 101,1045-1052(2003); 以及Cragg和Glennie,Blood 103,2738-2743(2004))。

[0428] 在一个实施方案中,与新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和性降低。在特别的实施方案中,根据本发明的突变Fc结构域呈现出降低的FcRn受体结合亲和性,如与天然IgG₁ Fc结构域相比。在一个这样的实施方案中,Fc结构域(或包含所述Fc结构域的抗体),与天然IgG₁ Fc结构域(或包含天然IgG₁ Fc结构域的抗体)相比,呈现出低于50%,优选低于20%,更优选低于10%和最优选低于5%的新生儿Fc受体结合活性,和/或与天然IgG₁ Fc结构域(或包含天然IgG₁ Fc结构域的抗体)相比,低于50%,优选低于20%,更优选低于10%和最优选低于5%的效应子功能。在一个实施方案中,突变Fc结构域(或包含所述突变Fc结构域的抗体)基本上不结合新生儿Fc受体。在特别的实施方案中,Fc受体是FcRn受体。在一个实施方案中,Fc受体是人FcRn受体。在特别的实施方案中,Fc结构域在位置I253、H310和H435包含氨基酸置换。在更特别的实施方案中,Fc结构域包含氨基酸突变I253A、H310A和H435A(“AAA”)。在一个这样的实施方案中,Fc结构域是IgG₁ Fc结构域,特别是人IgG₁ Fc结构域。氨基酸置换“AAA”组合几乎完全消除了人IgG₁ Fc结构域的FcRn受体结合。

[0429] 在特定的实施方案中,包含突变Fc区的抗体能够特异性结合CD20,并包含SEQ ID NO:112的重链序列和SEQ ID NO:113的轻链序列。在一个实施方案中,包含突变Fc区的抗体能够特异性结合FAP,并包含SEQ ID NO:114的重链序列和SEQ ID NO:115的轻链序列。在一个实施方案中,包含突变Fc区的抗体能够特异性结合CEA,并包含SEQ ID NO:116的重链序列和SEQ ID NO:117的轻链序列,SEQ ID NO:118的重链序列和SEQ ID NO:119的轻链序列,SEQ ID NO:120的重链序列和SEQ ID NO:121的轻链序列,或SEQ ID NO:122的重链序列和SEQ ID NO:123的轻链序列。在其它实施方案中,包含突变Fc区的抗体能够特异性结合肌腱蛋白(TNC),并包含SEQ ID NO:124的重链序列和SEQ ID NO:125的轻链序列。在更多实施方案中,包含突变Fc区的抗体是双特异性抗体,例如,T细胞激活性双特异性抗体。在一个这样

的实施方案中,双特异性抗体包含能够特异性结合T细胞激活性靶(特别是CD3)的第一结合部分和能够特异性结合如本文所述的肿瘤抗原的第二结合部分。

[0430] 在一个实施方案中,包含突变Fc区的抗体是双特异性的,并能够特异性结合Her2,其中双特异性抗体包含SEQ ID NO:126的第一重链序列,SEQ ID NO:127的第一轻链序列,SEQ ID NO:128的第二重链序列和SEQ ID NO:129的第二轻链序列。

[0431] 在本发明的举例说明性实施方案中,作为概念的证明,提供了试剂盒,所述试剂盒包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列(“抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD”(通过SEQ ID NO:19中所示的DNA序列编码))、以及包含SEQ ID NO:112的重链和SEQ ID NO:113的轻链的抗体。或者,试剂盒可以包含SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列(“抗-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD”(由SEQ ID NO:35中所示的DNA序列编码))、以及包含SEQ ID NO:112的重链和SEQ ID NO:113的轻链的抗体。此外,在本发明的内容中,试剂盒可以包含SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列(“抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD”(由SEQ ID NO:44中所示的DNA序列编码))、以及包含SEQ ID NO:112的重链和SEQ ID NO:113的轻链的抗体。或者,试剂盒可以包含SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列(“抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD”(由SEQ ID NO:51中所示的DNA序列编码))、以及包含SEQ ID NO:112的重链和SEQ ID NO:113的轻链的抗体。或者,试剂盒可以包含SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列(“抗-AAA-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD”)、以及包含SEQ ID NO:112的重链和SEQ ID NO:113的轻链的抗体。此外,在本发明的内容中,试剂盒可以包含SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列(“抗-AAA-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD”)、以及包含SEQ ID NO:112的重链和SEQ ID NO:113的轻链的抗体。此外,在本发明的内容中,试剂盒可以包含至少一个抗体分子,其包含选自SEQ ID NO:112和SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116和SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122和SEQ ID NO:123、以及SEQ ID NO:124和SEQ ID NO:125的重链和轻链。此外,在本发明的内容中,试剂盒可以包含双特异性抗体分子,特别是包含SEQ ID NO:128的第一重链、SEQ ID NO:129的第一轻链、SEQ ID NO:130的第二重链和SEQ ID NO:131的第二轻链的双特异性抗体。

[0432] 此外,本发明的试剂盒的各部分可以单独包装在小瓶或瓶子中,或组合包装在容器或多容器装置中。另外,本发明的试剂盒可以包含(封闭的)袋装细胞孵育系统,其中可以用本发明的一个或多个抗原结合受体转导患者细胞(优选T细胞)并在GMP(良好生产规范,如由欧洲委员会在http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index_en.htm下发布的良好制造实践指南中所述的)条件下孵育。此外,本发明的试剂盒可以包含(封闭的)袋装细胞孵育系统,其中可以用本发明的一个或多个抗原结合受体转导分离/获得的患者T细胞并在GMP下孵育。此外,在本发明的内容中,试剂盒还可以包含编码本文所述的抗原结合受体(一个或多个)的载体。本发明的试剂盒特别可以有利地用于进行本发明的方法并且可以用于本文提及的各种应用中,例如,作为研究工具或医疗工具。试剂盒的制造优选遵循本领域技术人员已知的标准程序。

[0433] 在此,可以使用如上所述的试剂盒,用本文所述的能够特异性结合突变Fc结构域的本发明抗原结合受体,转导患者来源的细胞,优选T细胞。包含能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域,不在T细胞中或T细胞上天然产生。因此,用本发明的试

剂盒转导的患者来源细胞将获得特异性结合抗体(例如,治疗抗体)的突变Fc结构域的能力,并且将变得能够通过与包含突变Fc结构域的治疗抗体相互作用而诱导靶细胞的消除/裂解,其中治疗抗体能够结合在肿瘤表面上天然产生的肿瘤特异性抗原(即内源表达的)。如本文所述的抗原结合受体的胞外结构域的结合,将通过包含突变Fc结构域的治疗抗体,激活T细胞并与肿瘤细胞物理接触。未转导的或内源性T细胞(例如,CD8+T细胞)不能结合包含突变Fc结构域的治疗抗体的突变Fc结构域。表达能够特异性结合突变Fc结构域的胞外结构域的抗原结合受体的转导T细胞,不受如本文中所述的在Fc结构域中不含突变的治疗抗体的影响。因此,表达本发明的抗原结合受体分子的T细胞具有在体内和/或在体外,在如本文所述的Fc结构域中包含突变的抗体存在下,裂解靶细胞的能力。相应的靶细胞包含表达表面分子的细胞,表面分子即在肿瘤细胞表面上天然产生的肿瘤特异性抗原,其被本文所述的治疗抗体的至少一个(优选两个)结合结构域识别。下文中表征这样的表面分子。

[0434] 可以通过本领域已知的方法来检测靶细胞的裂解。因此,这样的方法特别包括体外生理学测定。这样的生理测定可以监测细胞死亡,例如,通过细胞膜完整性的失去(例如,基于FACS的碘化丙啶测定法、台盼蓝流入测定法、光度测定酶释放测定法(LDH)、放射性⁵¹Cr释放测定法、荧光测定铕释放和钙黄绿素-AM释放测定法)。其它测定法包括监测细胞活力,例如,通过光度测定MTT、XTT、WST-1和阿尔玛蓝测定法、放射性³H-Thd掺入测定法、测量细胞分裂活性的克隆形成测定法、和测量线粒体跨膜梯度的荧光测定若丹明123测定法。此外,例如,可以通过基于FACS的磷脂酰丝氨酸暴露测定、基于ELISA的TUNEL测试、胱天蛋白酶活性测定(光度测定、荧光测定或基于ELISA的),或通过分析改变的细胞形态(收缩、膜起泡)来监测。

[0435] 能够表达本发明的抗原结合受体的转导T细胞

[0436] 本发明的再一个方面是能够表达本发明的抗原结合受体的转导T细胞。本文所述的抗原结合受体涉及天然不包含在T细胞之中和/或之上的且不是(内源性地)在正常(非转导)T细胞之中或之上表达的分子。因此,将在T细胞之中和/或之上的本发明抗原结合受体人工引入T细胞中。在本发明的内容中,所述T细胞,优选CD8+T细胞,可以从本文定义的待治疗的受试者分离/获得。因此,人工引入并随后存在于所述T细胞之中和/或表面上的本文所述的抗原结合受体,包含含有一个或多个可接近(体外或体内)(Ig衍生的)免疫球蛋白(优选抗体,特别是抗体的Fc结构域)的抗原结合部分的结构域。在本发明的内容中,这些人工引入的分子在下文所述的(逆转录病毒或慢病毒)转导后存在于所述T细胞之中和/或表面上。因此,转导后,根据本发明的T细胞可以通过免疫球蛋白(优选如本文所述在Fc结构域中包含特定突变的(治疗)抗体)来激活。

[0437] 本发明还涉及转导的T细胞,其表达由编码本发明的抗原结合受体的核酸分子(一个或多个)编码的抗原结合受体。因此,在本发明的内容中,转导的T细胞可以包含编码本发明的抗原结合受体的核酸分子或表达本发明的抗原结合受体的本发明载体。

[0438] 在本发明的内容中,术语“转导的T细胞”涉及遗传修饰的T细胞(即,其中已经有意引入核酸分子的T细胞)。本文提供的转导T细胞可以包含本发明的载体。优选,本文提供的转导T细胞包含编码本发明的抗原结合受体的核酸分子和/或本发明的载体。本发明的转导T细胞可以是瞬时或稳定表达外源DNA(即,已经引入T细胞中的核酸分子)的T细胞。特别地,使用逆转录病毒或慢病毒转导,可以将编码本发明的抗原结合受体的核酸分子稳定地整合

至T细胞的基因组中。通过使用mRNA转染,可以瞬时表达编码本发明的抗原结合受体的核酸分子。优选,本文提供的转导T细胞已经通过病毒载体(例如,逆转录病毒载体或慢病毒载体)在T细胞中引入核酸分子进行了遗传修饰。因此,抗原结合受体的表达可以是组成型的并且可在细胞表面上检测到抗原结合受体的胞外结构域。抗原结合受体的这个胞外结构域可以包含本文定义的抗原结合受体的完整胞外结构域,也可以是其一部分。所需的最小大小是抗原结合受体中抗原结合部分的抗原结合位点。

[0439] 在诱导型或遏制型启动子控制下将抗原结合受体引入T细胞的情况下,表达也可以是条件型的或诱导型的。这样的诱导型或遏制型启动子的实例可以是含有醇脱氢酶I(*alcA*)基因启动子和反式激活蛋白AlcR的转录系统。可以使用不同的基于农业醇的制剂来控制连接*alcA*启动子的目标基因的表达。此外,四环素响应性启动子系统可以在四环素存在下起作用以激活或抑制基因表达系统。该系统的一些要素包括四环素阻遏蛋白(TetR)、四环素操纵子序列(tetO)和四环素反式激活因子融合蛋白(tTA),它是TetR与单纯疱疹病毒蛋白16(VP16)激活序列的融合体。此外,可以使用类固醇响应性启动子、金属调节的或致病相关(PR)蛋白相关的启动子。

[0440] 根据所使用的系统,表达可以是组成型的或组成式的。本发明的抗原结合受体可以在本文提供的转导T细胞的表面上表达。可以在细胞表面上检测到抗原结合受体的胞外部分(即,抗原结合受体的胞外结构域),而胞内部分(即,共刺激信号传导结构域和刺激信号传导结构域)在细胞表面上是不可检测到的。可以通过使用特异性结合该胞外结构域的抗体或通过胞外结构域能够结合的突变Fc结构域,来进行抗原结合受体的胞外结构域的检测。可以使用这些抗体或Fc结构域,通过流式细胞术或显微镜来检查胞外结构域。

[0441] 本发明的转导细胞可以是任何免疫细胞。这些包括但不限于B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤(NK)T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、固有淋巴细胞(IInnate lymphoid cells,)、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞或嗜中性粒细胞。优选,所述免疫细胞是淋巴细胞,优选NK或T细胞。所述T细胞包括CD4 T细胞和CD8 T细胞。结合包含突变Fc结构域的治疗抗体,在白细胞表面上触发本发明的抗原结合受体将赋予该细胞对靶细胞的细胞毒性,而与细胞起源的谱系无关。与选择用于抗原结合受体的刺激信号传导结构域或共刺激信号传导结构域无关,细胞毒性都会发生,并且不依赖于另外的细胞因子的外源供应。因此,本发明的转导细胞可以是例如CD4+T细胞、CD8+T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤(NK)T细胞、自然杀伤(NK)细胞、肿瘤-浸润淋巴细胞(TIL)细胞、骨髓细胞或间充质干细胞。优选,本文提供的转导细胞是T细胞(例如,自体T细胞),更优选,转导细胞是CD8+T细胞。因此,在本发明的内容中,转导的细胞是CD8+T细胞。此外,在本发明的内容中,转导的细胞是自体T细胞。因此,在本发明的内容中,转导细胞优选是自体CD8+T细胞。除了使用从受试者分离的自体细胞(例如,T细胞)外,本发明还包括同种异体细胞的使用。因此,在本发明的内容中,转导的细胞也可以是同种异体细胞,例如同种异体CD8+T细胞。同种异体细胞的使用是基于以下事实:细胞,优选T细胞,可以识别由外来抗原呈递细胞(APC)呈递的特定抗原表位,只要APC表达该特异性应答细胞群(即T细胞群)所受限于的I类或II类MHC分子、以及该T细胞所识别的抗原表位。因此,术语同种异体是指来自无关的供体个体/受试者的细胞,所述个体/受试者与将通过例如本文所述的表达抗原结合受体的转导细胞治疗的个体/受试者是人白细胞抗原(HLA)相容的。自体细胞是指如上文所述从将用本文所述的转导细胞治疗的受试者分离/获得的细

胞。

[0442] 本发明的转导细胞可以用其他核酸分子,例如,编码T细胞受体的核酸分子,共转导。

[0443] 本发明还涉及用于生产表达本发明的抗原结合受体的转导T细胞的方法,包括以下步骤:用本发明的载体转导T细胞,在允许抗原结合受体在所述转导细胞之中或之上表达的条件下培养转导的T细胞和收集所述转导的T细胞。

[0444] 在本发明的内容中,优选通过以下方法来产生本发明的转导细胞:从受试者(优选人患者)分离/获得细胞(例如,T细胞,优选CD8+T细胞)。用于从患者或从供体分离/获得细胞(例如,T细胞,优选CD8+T细胞)的方法是本领域公知的,并且在本发明的内容中,可以通过抽血或通过取骨髓从患者或从供体分离细胞(例如,T细胞,优选CD8+T细胞)。作为患者的样品分离/获得细胞后,将细胞(例如,T细胞)与样品的其他成分分离。用于从样品分离细胞(例如,T细胞)的几种方法是已知的并且包括,不限于,例如,用于从患者或从供体的外周血样品中获得细胞的白细胞采集术(leukapheresis),通过使用FACSort装置分离/获得细胞,通过手动或通过使用显微操纵器从带有活细胞的新鲜活组织检查样本中从死细胞中挑取出活细胞(参见,例如,Dudley, Immunother. 26 (2003), 332-342; Robbins, Clin. Oncol. 29 (2011), 917-924或Leisegang, J. Mol. Med. 86 (2008), 573-58)。随后培养和扩增分离/获得的细胞,T细胞,优选CD8+T细胞,例如,通过使用抗CD3抗体,通过使用抗CD3和抗CD28单克隆抗体和/或通过使用抗CD3抗体、抗CD28抗体和白介素-2(IL-2)(参见,例如,Dudley, Immunother. 26 (2003), 332-342或Dudley, Clin. Oncol. 26 (2008), 5233-5239)。

[0445] 在随后的步骤中,通过本领域已知的方法(参见,例如,Lemoine, J Gene Med 6 (2004), 374-386),人工/遗传修饰/转导细胞(例如,T细胞)。用于转导细胞(例如,T细胞)的方法是本领域已知的并且包括,不限于,在其中转导核酸或重组核酸的情况下,例如,电穿孔方法、磷酸钙方法、阳离子脂质方法或脂质体方法。通过使用商业可得的转染剂,例如,Lipofectamine(由Invitrogen制造,目录号:11668027),可以方便和高效地转导待转导的核酸。在其中使用载体的情况下,可以以上述核酸相同的方式转导载体,只要载体是质粒载体(即,不是病毒载体的载体)即可。在本发明的内容中,用于转导细胞(例如,T细胞)的方法包括逆转录或慢病毒T细胞转导,非病毒载体(例如,睡美人迷你环状载体)以及mRNA转染。“mRNA转染”是指本领域技术人员公知的方法,以在待转导的细胞中瞬时表达目标蛋白,如在本发明的情况下,本发明的抗原结合受体。简而言之,可以通过使用电穿孔系统(如,例如,Gene Pulser,Bio-Rad),用编码本发明的抗原结合受体的mRNA,电穿孔细胞,并此后通过如上所述标准细胞(例如,T细胞)培养方案来培养(参见Zhao等,Mol Ther. 13 (1) (2006), 151-159)。本发明的转导细胞可以是T细胞,最优先选CD8+T细胞,并且可以通过慢病毒产生,或最优先,通过逆转录病毒T细胞转导来产生。

[0446] 在此,用于转导T细胞的合适的逆转录病毒载体是本领域已知的,如SAMEN CMV/Sra(Clay等,J. Immunol. 163 (1999), 507-513)、LZRS-id3-IHRES(Heemskerk等,J. Exp. Med. 186 (1997), 1597-1602)、FeLV(Neil等,Nature 308 (1984), 814-820)、SAX(Kantoff等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 6563-6567)、pDOL(Desiderio,J. Exp. Med. 167 (1988), 372-388)、N2(Kasid等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 473-477)、LNL6(Tiberghien等,Blood 84 (1994), 1333-1341)、pZipNEO(Chen等,J. Immunol. 153

(1994), 3630-3638)、LASN (Mullen等, Hum. Gene Ther. 7 (1996), 1123-1129)、pG1XsNa (Taylor等, J. Exp. Med. 184 (1996), 2031-2036)、LCNX (Sun等, Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048)、SFG (Gallardo等, Blood 90 (1997) 和LXSN (Sun等, Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048)、SFG (Gallardo等, Blood 90 (1997), 952-957)、HMB-Hb-Hu (Vieillard等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 11595-11600)、pMV7 (Cochlovius等, Cancer Immunol. Immunother. 46 (1998), 61-66)、pSTITCH (Weitjens等, Gene Ther 5 (1998), 1195-1203)、pLZR (Yang等, Hum. Gene Ther. 10 (1999), 123-132)、pBAG (Wu等, Hum. Gene Ther. 10 (1999), 977-982)、rKat.43.267bn (Gilham等, J. Immunother. 25 (2002), 139-151)、pLGSN (Engels等, Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168)、pMP71 (Engels等, Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168)、pGCSAM (Morgan等, J. Immunol. 171 (2003), 3287-3295)、pMSGV (Zhao等, J. Immunol. 174 (2005), 4415-4423) 或pMX (de Witte等, J. Immunol. 181 (2008), 5128-5136)。在本发明的内容中,用于转导细胞(例如, T细胞)的合适的慢病毒载体是,例如,PL-SIN慢病毒载体 (Hotta等, Nat Methods. 6 (5) (2009), 370-376)、p156RRL-sinPPT-CMV-GFP-PRE/NheI (Campeau等, PLoS One 4 (8) (2009), e6529)、pCMVR8.74 (Addgene Catalogue No.: 22036)、FUGW (Lois等, Science 295 (5556) (2002), 868-872)、pLVX-EF1 (Addgene 目录号 No.: 64368)、pLVE (Brunger等, Proc Natl Acad Sci U S A 111 (9) (2014), E798-806)、pCDH1-MCS1-EF1 (Hu等, Mol Cancer Res. 7 (11) (2009), 1756-1770)、pSLIK (Wang等, Nat Cell Biol. 16 (4) (2014), 345-356)、pLJM1 (Solomon等, Nat Genet. 45 (12) (2013), 1428-30)、pLX302 (Kang等, Sci Signal. 6 (287) (2013), rs13)、pHR-IG (Xie等, J Cereb Blood Flow Metab. 33 (12) (2013), 1875-85)、pRRLSIN (Addgene 目录号 No.: 62053)、pLS (Miyoshi等, J Virol. 72 (10) (1998), 8150-8157)、pLL3.7 (Lazebnik等, J Biol Chem. 283 (7) (2008), 11078-82)、FRIG (Raissi等, Mol Cell Neurosci. 57 (2013), 23-32)、pWPT (Ritz-Laser等, Diabetologia. 46 (6) (2003), 810-821)、pBOB (Marr等, J Mol Neurosci. 22 (1-2) (2004), 5-11) 或pLEX (Addgene 目录号 No.: 27976)。

[0447] 本发明的转导T细胞/T细胞优选在受控的条件下,在其天然环境外生长。特别地,术语“培养”表示源自多细胞真核生物(优选来自人患者)的细胞(例如,本发明的转导细胞)在体外生长。培养细胞是将从初始组织来源分离的细胞保持存活的实验室技术。在本文中,在允许本发明的抗原结合受体在所述转导细胞之中或之上表达的条件下培养本发明的转导细胞。允许转基因(即,本发明的抗原结合受体)表达的条件是本领域已知的,并且包括,例如,激动性抗CD3和抗CD28抗体,以及添加细胞因子,如白介素2(IL-2)、白介素7(IL-7)、白介素12(IL-12)和/或白介素15(IL-15)。本发明的抗原结合受体在培养的转导细胞(例如,CD8+T)中表达后,从培养物(即,从培养基)回收(即,再提取)转导的细胞。

[0448] 因此,本发明还包括,可通过本发明的方法获得的转导的细胞,优选T细胞,特别是CD8+T细胞,所述细胞表达由本发明核酸分子编码的抗原结合受体。

[0449] 核酸分子

[0450] 本发明的另一个方面是编码一个或几个本发明的抗原结合受体的核酸和载体。编码本发明的抗原结合受体的示例性核酸分子显示于SEQ ID NO:19、30、35、38、44、47、51和52。本发明的核酸分子可以在调控序列的控制下。例如,可以使用启动子、转录增强子和/或允许本发明的抗原结合受体诱导表达的序列。在本发明的内容中,在组成型或诱导型启动

子的控制下表达核酸分子。合适的启动子是例如CMV启动子(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、UBC启动子(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、PGK(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、EF1A启动子(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、CAGG启动子(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、SV40启动子(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、COPIA启动子(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、ACT5C启动子(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、TRE启动子(Qin等,PLoS One 5(5) (2010),e10611)、Oct3/4启动子(Chang等,Molecular Therapy 9 (2004),S367-S367 (doi:10.1016/j.ymthe.2004.06.904))或Nanog启动子(Wu等,Cell Res.15(5) (2005),317-24)。本发明因此还涉及包含本发明中所述的核酸分子的载体。本文的术语载体涉及环状或线性核酸分子,所述分子在已经引入其的宿主细胞中(即,在转导的细胞中)可以自主复制。许多合适的载体是分子生物学的技术人员已知的,其选择将取决于所需的功能并且包括遗传工程中常用的质粒、粘粒、病毒、噬菌体和其他载体。本领域技术人员公知的方法可以用于构建各种质粒和载体;参见,例如,Sambrook等(在上述引文中)和Ausubel,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.(1989),(1994)中所述的技术。或者,本发明的多核苷酸和载体可以重构在脂质体中,用于递送至靶细胞。如以下进一步详细讨论的,使用克隆载体来分离各单独的DNA序列。相关的序列可以转移至特定多肽表达所需的表达载体中。典型的克隆载体包括pBluescript SK,pGEM,pUC9,pBR322,pGA18和pGBT9。典型的表达载体包括pTRE,pCAL-n-EK,pESP-1,pOP13CAT。

[0451] 本发明还涉及包含核酸分子的载体,其中所述核酸分子是可操作地连接编码本文定义的抗原结合受体的所述核酸分子的调控序列。在本发明的内容中,载体可以是多顺反子。这样的调控序列(控制元件)是技术人员已知的并且可以包括启动子、剪接盒、翻译启动密码子、用于将插入片段引入载体中的翻译和插入位点。在本发明的内容中,所述核酸分子可操作地连接所述表达控制序列,从而允许在真核或原核细胞中表达。考虑所述载体是包含编码本文定义的抗原结合受体的核酸分子的表达载体。可操作地连接是指组分的并置,所述并置使得所述的组分处于允许它们以预期的方式起作用的关系中。可操作地连接编码序列的控制序列以如下方式连接,所述方式导致编码序列在与控制序列相容的条件下实现表达。当控制序列是启动子时,对于技术人员显而易见的是,优选使用双链核酸。

[0452] 在本发明的内容中,所述载体是表达载体。表达载体是可以用于转化选定的细胞并在选定的细胞中提供编码序列的表达的构建体。表达载体可以例如是克隆载体、二元载体或整合载体。表达包括核酸分子的转录,优选转录成可翻译的mRNA。确保在原核和/或真核细胞中表达的调控元件是本领域技术人员公知的。在真核细胞的情况下,它们通常包括确保转录起始的启动子以及任选地确保转录终止和转录产物稳定的poly-A信号。允许在原核宿主细胞中表达的可能调控元件包括,例如,大肠杆菌中的PL、lac、trp或tac启动子,并且允许在真核宿主细胞中表达的调控元件的实例是酵母中的AOX1或GAL1启动子或哺乳动物和其他动物细胞中的CMV-、SV40、RSV-启动子(劳氏肉瘤病毒)、CMV增强子、SV40增强子或珠蛋白内含子。

[0453] 除了负责转录起始的元件,这样的调控元件还可以包括位于多核苷酸下游的转录终止信号,如SV40-poly-A位点或tk-poly-A位点。此外,根据所用的表达系统,可以将编码能够指引多肽至细胞区隔或将其分泌至介质中的信号肽的前导序列,添加至所述核酸序列

的编码序列上，并且所述前导序列是本领域公知的；还可以参见，例如，所附实施例。

[0454] 前导序列与翻译、启动和终止序列装配在合适的相中，并且优选，前导序列能够指引翻译的蛋白质或其一部分分泌至细胞周质间隙或胞外介质中。任选，异源序列可以编码包括赋予期望特征的N-末端识别肽的抗原结合受体，期望特征为例如表达的重组产物的稳定化或简化的纯化；参见上文。在此，合适的表达载体是本领域已知的，如Okayama-Berg cDNA表达载体pcDV1 (Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (In-vitrogen)、pEF-DHFR、pEF-ADA或pEF-neo (Raum等, Cancer Immunol Immunother 50 (2001), 141-150) 或pSPORT1 (GIBCO BRL)。

[0455] 在本发明的内容中，表达控制序列可以是在能够转化或转染真核细胞的载体中的真核启动子系统，但也可以使用用于原核细胞的控制序列。一旦载体已经整合至合适的细胞中，将细胞维持在适于核苷酸序列高水平表达的以及期望的条件下。另外的调控元件可以包括转录以及翻译增强子。有利地，本发明的上述载体包含可选择和/或评分标记。对于转化的细胞以及例如植物组织和植物的选择有用的选择标记基因，是本领域技术人员公知的，并且包括例如作为选择基础的如下抗代谢物抗性：dhfr，其赋予对氨甲蝶呤的抗性 (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149)；npt，其赋予对氨基糖苷类新霉素、卡那霉素和巴龙霉素的抗性 (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995)；和hygro，其赋予对潮霉素的抗性 (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485)。另外的选择基因已经有描述，即trpB，其允许细胞利用吲哚以替代色氨酸；hisD，其允许细胞利用组氨醇以替代组氨酸 (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047)；甘露糖-6-磷酸异构酶，其允许细胞利用甘露糖 (WO 94/20627)；和ODC (鸟氨酸脱羧酶)，其赋予对鸟氨酸脱羧酶抑制剂、2-(二氟甲基)-DL-鸟氨酸、DFMO的抗性 (McConlogue, 1987, 见: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory编辑)；或来自土曲霉 (Aspergillus terreus) 的脱氨酶，其赋予对杀稻瘟菌素S的抗性 (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338)。

[0456] 有用的可评分标记也是本领域技术人员已知的并且可商业购得。有利地，所述标记是编码萤光素酶 (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121)、绿色荧光蛋白 (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) 或 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901-3907) 的基因。此实施方案对于含有所述载体的细胞、组织和生物体的简单且快速的筛选特别有用。

[0457] 如上所述，所述核酸分子可以单独使用或作为载体的一部分，以在细胞中表达本发明的抗原结合受体，例如，用于过继性T细胞疗法，也可以用于基因治疗目的。将含有编码本文所述的任一个抗原结合受体的DNA序列的核酸分子或载体引入细胞中，其转而产生目标多肽。基于离体或体内技术将治疗基因引入细胞中的基因疗法，是基因转移的最重要的应用之一。在用于体外或体内基因疗法的方法或基因递送系统中，合适的载体、方法或基因递送系统描述于文献中并且是本领域技术人员已知的；参见，例如，Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhäuser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91 (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N. Y. Acad. Sci. 811 (1997), 289-292;

Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; US 5,580,859; US 5,589,466; 或 Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640。所述核酸分子和载体可以设计成用于直接引入或用于通过脂质体或病毒载体(例如,腺病毒、逆转录病毒)引入细胞中。在本发明的内容中,所述细胞是T细胞,如CD8+T细胞、CD4+T细胞、CD3+T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或自然杀伤(NK)T细胞,优选CD8+T细胞。

[0458] 根据以上,本发明涉及获得载体(特别是遗传工程中常规使用的质粒、粘粒和噬菌体)的方法,所述载体包含编码本文定义的抗原结合受体的多肽序列的核酸分子。在本发明的内容中,所述载体是表达载体和/或基因转移或靶向载体。源自病毒(如逆转录病毒、痘苗病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛乳头瘤病毒)的表达载体可以用于将所述多核苷酸或载体递送至靶细胞群中。

[0459] 本领域技术人员公知的方法可以用于构建重组载体;参见,例如,Sambrook等(在上述引文中)、Ausube1(1989,在上述引文中)或其他标准教科书中描述的技术。或者,所述核酸分子和载体可以重构在脂质体中,用于递送至靶细胞。含有本发明的核酸分子的载体可以通过公知的方法转移至宿主细胞中,所述方法根据细胞宿主的类型而改变。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可以用于其他细胞宿主;参见Sambrook,上引文。所述载体可以特别是pEF-DHFR、pEF-ADA或pEF-neo。载体pEF-DHFR、pEF-ADA和pEF-neo在本领域中已经有描述,例如,在Mack等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92 (1995), 7021-7025和Raum等,Cancer Immunol Immunother 50 (2001), 141-150。

[0460] 本发明还提供用本文所述的载体转化或转染的T细胞。所述T细胞可以通过将至少一个上述的载体或至少一个上述的核酸分子引入T细胞或其前体细胞来产生。T细胞中所述至少一个载体或至少一个核酸分子的存在可以介导编码上述抗原结合受体的基因的表达,所述抗原结合受体包含含有能够特异性结合突变Fc结构域的抗原结合部分的胞外结构域。本发明的载体可以是多顺反子。

[0461] 引入T细胞或其前体细胞中的所述核酸分子或载体可以整合至细胞的基因组中或其可以维持在染色体外。

[0462] 肿瘤特异性抗原

[0463] 如上所述,包含突变Fc结构域的本文所述抗体的(Ig衍生的)结构域可以包含对细胞表面分子具有特异性的抗原相互作用位点,所述细胞表面分子即在肿瘤细胞表面上天然产生的肿瘤特异性抗原。在本发明的内容中,这样的抗体将使得本文所述的包含本发明的抗原结合受体的转导T细胞与肿瘤细胞物理接触,其中转导的T细胞被激活。本发明的转导T细胞的激活可以导致本文所述的肿瘤细胞的裂解。

[0464] 下文中给出了在肿瘤细胞表面上天然产生的肿瘤标记的实例,并且包括,但不限于,FAP(成纤维细胞激活蛋白)、CEA(癌胚抗原)、p95(p95HER2)、BCMA(B细胞成熟抗原)、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、MSLN(间皮素)、MCSP(黑色素瘤硫酸软骨素蛋白多糖)、HER-1(人表皮生长因子1)、HER-2(人表皮生长因子2)、HER-3(人表皮生长因子3)、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52F1t3、叶酸受体1(FOLR1)、人滋养细胞细胞表面抗原2(Trop-2)、癌抗原12-5(CA-12-5)、人白细胞抗原-抗原D相关(HLA-DR)、MUC-1(粘蛋白-1)、A33抗原、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、FMS样酪氨酸激酶3(FLT-3)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PSCA(前

列腺干细胞抗原)、转铁蛋白受体、TNC(肌腱蛋白)、碳酸酐酶IX(CA-IX)和/或结合人主要组织相容性复合物(MHC)分子的肽。

[0465] 因此,在本发明的内容中,本文所述的抗原结合受体结合抗体的突变Fc结构域,所述抗体即能够特异性结合肿瘤细胞表面上天然产生的抗原/标记的治疗抗体,所述抗原/标记选自:FAP(成纤维细胞激活蛋白)、CEA(癌胚抗原)、p95(p95HER2)、BCMA(B细胞成熟抗原)、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、MSLN(间皮素)、MCSP(黑色素瘤硫酸软骨素蛋白多糖)、HER-1(人表皮生长因子1)、HER-2(人表皮生长因子2)、HER-3(人表皮生长因子3)、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52F1t3、叶酸受体1(FOLR1)、人滋养细胞细胞表面抗原2(Trop-2)、癌抗原12-5(CA-12-5)、人白细胞抗原-抗原D相关(HLA-DR)、MUC-1(粘蛋白-1)、A33抗原、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、FMS样酪氨酸激酶3(FLT-3)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PSCA(前列腺干细胞抗原)、转铁蛋白受体、TNC(肌腱蛋白)、碳酸酐酶IX(CA-IX)和/或结合人主要组织相容性复合物(MHC)分子的肽。

[0466] A33-抗原、BCMA(B细胞成熟抗原)、癌抗原12-5(CA-12-5)、碳酸酐酶IX(CA-IX)、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA(癌胚抗原)、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、FAP(成纤维细胞激活蛋白)、FMS-样酪氨酸激酶3(FLT-3)、叶酸受体1(FOLR1)、HER-1(人表皮生长因子1)、HER-2(人表皮生长因子2)、HER-3(人表皮生长因子3)、人白细胞抗原-抗原D相关(HLA-DR)、MSLN(间皮素)、MCSP(黑色素瘤硫酸软骨素蛋白多糖)、MUC-1(粘蛋白-1)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PSCA(前列腺干细胞抗原)、p95(p95HER2)、转铁蛋白受体、TNC(肌腱蛋白)、人滋养细胞细胞表面抗原2(Trop-2)的(人)成员的序列可在UniProtKB/Swiss-Prot数据库中获得并可以从<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes>找到。这些(蛋白质)序列还涉及注解的修饰序列。本发明还提供了其中使用本文提供的简明序列的同源序列以及还有遗传等位基因变体等的技术和方法。优选,使用本文的简明序列的变体等。优选,这样的变体是遗传变体。本领域技术人员可以容易地推断出在这些数据库条目中的这些(蛋白质)序列的相关编码区,所述数据库条目还可以包含基因组DNA以及mRNA/cDNA的条目。(人)FAP(成纤维细胞激活蛋白)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目Q12884(条目版本168,序列版本5);(人)CEA(癌胚抗原)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P06731(条目版本171,序列版本3);(人)EpCAM(表皮细胞粘附分子)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P16422(条目版本117,序列版本2);(人)MSLN(间皮素)的序列可以获自UniProt条目号Q13241(版本号132,序列版本2);(人)FMS-样酪氨酸激酶3(FLT-3)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P36888(主要可引用登录号)或Q13414(次要登录号),版本号165和序列版本2;(人)MCSP(黑色素瘤硫酸软骨素蛋白多糖)的序列可以获得UniProt条目号Q6UVK1(版本号118;序列版本2);(人)叶酸受体1(FOLR1)的序列可以获自UniProt条目号P15328(主要可引用登录号)或Q53EW2(次要登录号),版本号153和序列版本3;(人)滋养细胞细胞表面抗原2(Trop-2)的序列可以获自UniProt条目号P09758(主要可引用登录号)或Q15658(次要登录号),版本号172和序列版本3;(人)PSCA(前列腺干细胞抗原)的序列可以获自UniProt条目号043653(主要可引用登录号)或Q6UW92(次要登录号),版本号134和序列版本1;(人)HER-1(表皮生长因子受体)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P00533(条目版本177,序列版本2);(人)HER-2(受体酪氨酸-蛋白激酶erbB-2)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P04626(条目版本161,序列版本1);(人)

HER-3(受体酪氨酸-蛋白激酶erbB-3)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P21860(条目版本140,序列版本1);(人)CD20(B-淋巴细胞抗原CD20)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P11836(条目版本117,序列版本1);(人)CD22(B-淋巴细胞抗原CD22)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P20273(条目版本135,序列版本2);(人)CD33(B-淋巴细胞抗原CD33)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P20138(条目版本129,序列版本2);(人)CA-12-5(粘蛋白-16)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目Q8WXI7(条目版本66,序列版本2);(人)HLA-DR的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目Q29900(条目版本59,序列版本1);(人)MUC-1(粘蛋白-1)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P15941(条目版本135,序列版本3);(人)A33(细胞表面A33抗原)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目Q99795(条目版本104,序列版本1);(人)PSMA(谷氨酸羧肽酶2)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目Q04609(条目版本133,序列版本1);(人)转铁蛋白受体的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目Q9UP52(条目版本99,序列版本1)和P02786(条目版本152,序列版本2);(人)TNC(肌腱蛋白)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目P24821(条目版本141,序列版本3);或(人)CA-IX(碳酸酐酶IX)的序列可以获自Swiss-Prot数据库条目Q16790(条目版本115,序列版本2)。

[0467] 治疗用途和治疗方法

[0468] 本文提供的分子或构建体(即,抗原结合受体,转导的T细胞和试剂盒)在医疗情况中特别有用,特别是用于恶性疾病的治疗。例如,可以用表达本发明的抗原结合受体的转导T细胞,结合肿瘤细胞特异性的并包含突变Fc结构域的治疗抗体,来治疗肿瘤。因此,在某些实施方案中,将抗原结合受体、转导的T细胞或试剂盒用于恶性疾病的治疗中,特别是其中恶性疾病选自上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0469] 通过包含突变Fc结构域的治疗抗体提供了治疗的肿瘤特异性,其中在施用表达本发明的抗原结合受体的转导T细胞之前、同时或之后施用抗体。在此,转导的T细胞是通用T细胞,因为它们并不特异于给定的肿瘤,而是根据本发明使用的包含突变Fc结构域的治疗抗体,可以靶向任何肿瘤,

[0470] 在此,恶性疾病可以是上皮、内皮或间皮来源的癌症/瘤和血液癌症。在本发明的内容中,癌症/瘤选自胃肠癌,胰腺癌,胆管细胞癌,肺癌,乳腺癌,卵巢癌,皮肤癌,口腔癌,胃癌,宫颈癌,B细胞和T细胞淋巴瘤,骨髓性白血病,卵巢癌,白血病,淋巴性白血病,鼻咽癌,结肠癌,前列腺癌,肾细胞癌,头颈癌,皮肤癌(黑素瘤),泌尿生殖道癌,例如睾丸癌,卵巢癌,内皮癌,宫颈癌和肾癌,胆管癌,食道癌,唾液腺癌和甲状腺癌,或其他肿瘤疾病,如血液肿瘤,胶质瘤,肉瘤或骨肉瘤。

[0471] 例如,可以使用针对这些医学适应症的特定构建体治疗肿瘤疾病和/或淋巴瘤。结合包含突变Fc结构域的治疗抗体施用的本发明转导T细胞的适应症,由治疗抗体对肿瘤抗原的特异性来确定。例如,可以使用包含突变Fc结构域的抗体来治疗胃肠癌,胰腺癌,胆管细胞癌,肺癌,乳腺癌,卵巢癌,皮肤癌和/或口腔癌,其中抗体针对(人)EpCAM(在肿瘤细胞表面上天然产生的肿瘤特异性抗原)。

[0472] 可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后,施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌,其中抗体针对HER1,优选人HER1。此外,可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或

之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、成胶质细胞瘤和/或口腔癌，其中抗体针对MCSP，优选人MCSP。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、成胶质细胞瘤和/或口腔癌，其中抗体针对FOLR1，优选人FOLR1。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、成胶质细胞瘤和/或口腔癌，其中抗体针对Trop-2，优选人Trop-2。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、成胶质细胞瘤和/或口腔癌，其中抗体针对PSCA，优选人PSCA。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、成胶质细胞瘤和/或口腔癌，其中抗体针对EGFRvIII，优选人EGFRvIII。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、成胶质细胞瘤和/或口腔癌，其中抗体针对MSLN，优选人MSLN。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃癌、乳腺癌和/或宫颈癌，其中抗体针对HER2，优选人HER2。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃癌和/或肺癌，其中抗体针对HER3，优选人HER3。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗B细胞淋巴瘤和/或T细胞淋巴瘤，其中抗体针对CD20，优选人CD20。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗B细胞淋巴瘤和/或T细胞淋巴瘤，其中抗体针对CD22，优选人CD22。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗骨髓性白血病，其中抗体针对CD33，优选人CD33。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗卵巢癌、肺癌、乳腺癌和/或胃肠癌，其中抗体针对CD12-5，优选人CA12-5。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、白血病和/或鼻咽癌，其中抗体针对HLA-DR，优选人HLA-DR。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和/或胰腺癌，其中抗体针对MUC-1，优选人MUC-1。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗结肠癌，其中抗体针对A33，优选人A33。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗前列腺癌，其中抗体针对PSMA，优选人PSMA。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌，其中抗体针对转铁蛋白受体，优选人转铁蛋白受体。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗胰腺癌、肺癌和/或乳腺癌，其中抗体针对转铁蛋白受体，优选人转铁蛋白受体。可以在包含突变Fc结构域的治疗抗体施用之前、同时或之后，施用本发明的转导T细胞来治疗肾癌，其中抗体针对CA-IX，优选人CA-IX。因此，本发明还涉及用于治疗疾病、恶性疾病的方法，所述恶性疾病如上皮、内皮或间皮来源的癌症和/或血液癌症。

[0473] 在本发明的内容中，所述受试者是人。

[0474] 在本发明的内容中,用于疾病治疗的特定方法包括步骤:

[0475] (a) 从受试者分离T细胞,优选CD8+T细胞;

[0476] (b) 用本文所述的抗原结合受体转导所述分离的T细胞,优选CD8+T细胞;和

[0477] (c) 将转导的T细胞,优选CD8+T细胞,施用于所述受试者。

[0478] 在本发明的内容中,可以通过静脉内输注,将所述转导的T细胞,优选CD8+T细胞,和/或一种或多种治疗抗体共施用于所述受试者。

[0479] 此外,在本发明的内容中,提供了用于疾病治疗的方法,包括步骤

[0480] (a) 从受试者分离T细胞,优选CD8+T细胞;

[0481] (b) 用本文所述的抗原结合受体转导所述分离的T细胞,优选CD8+T细胞;

[0482] (c) 任选用T细胞受体共转导所述分离的T细胞,优选CD8+T细胞;

[0483] (d) 通过抗CD3和抗CD28抗体扩增T细胞,优选CD8+T细胞;和

[0484] (e) 将转导的T细胞,优选CD8+T细胞,施用于所述受试者。

[0485] 上述步骤(d) (称为通过抗CD3和/或抗CD28抗体扩增T细胞(如TIL)的步骤)也可以在(刺激性)细胞因子的存在下进行,如白介素-2和/或白介素-15(IL-15)。在本发明的内容中,上述步骤(d) (称为通过抗CD3和/或抗CD28抗体扩增T细胞(如TIL)的步骤)也可以在白介素(IL-12)、白介素-7(IL-7)和/或白介素-21(IL-21)的存在下进行。

[0486] 此外,用于治疗的方法还包括施用根据本发明使用的抗体。可以在施用转导T细胞之前、同时或之后施用所述抗体。在本发明的内容中,可以通过静脉内输注,进行转导T细胞的施用。在本发明的内容中,转导T细胞从待治疗受试者分离/获得。

[0487] 组合物

[0488] 此外,本发明提供了包含具有突变Fc结构域的抗体分子、包含本发明的抗原结合受体的转导T细胞、编码根据本发明的抗原结合受体的核酸分子和载体的组合物(药物),和包含一种或多种所述组合物的试剂盒。在本发明的内容中,组合物是药物组合物,其任选进一步包含合适制剂的载体、稳定剂和/或赋形剂。因此,在本发明的内容中,提供了药物组合物(药物),其包含含有本文限定的突变Fc结构域的抗体分子,将其组合包含本文所述的抗原结合受体的转导T细胞和/或包含所述转导T细胞的组合物来施用,其中在施用包含本发明的抗原结合受体的转导T细胞之前、同时或之后,施用所述抗体分子。

[0489] 根据本发明,术语“药物组合物”涉及用于施用于患者(优选人患者)的组合物。此外,在本发明的内容中,患者患有疾病,其中所述疾病是恶性疾病,尤其是上皮、内皮或间皮来源的癌症/瘤或血液癌症。在本发明的内容中,癌症/瘤选自胃肠癌,胰腺癌,胆管细胞癌,肺癌,乳腺癌,卵巢癌,皮肤癌,口腔癌,胃癌,宫颈癌,B和T细胞淋巴瘤,骨髓性白血病,卵巢癌,白血病,淋巴性白血病,鼻咽癌,结肠癌,前列腺癌,肾细胞癌,头颈癌,皮肤癌(黑素瘤),泌尿生殖道癌,例如睾丸癌,内皮癌,宫颈癌和肾癌,胆管癌,食道癌,唾液腺癌和甲状腺癌,或其他肿瘤疾病,如血液肿瘤,胶质瘤,肉瘤或骨肉瘤。

[0490] 在优选实施方案中,药物组合物/药物包含如本文定义的抗体和/或转导T细胞,用于胃肠外、经皮、腔内、动脉内、静脉内、鞘内施用,或直接注入组织或肿瘤中。在本发明的内容中,组合物/药物包含含有如本文限定的突变Fc结构域的抗体,其中所述抗体将在包含如本文限定的抗原结合受体的转导T细胞之前、同时或之后施用。在本发明的内容中,可以组合包含转导T细胞的组合物/药物来施用包含如本文限定的抗体的药物组合物/药物,所述

转导T细胞包含如本文限定的抗原结合受体,其中所述T细胞获自待治疗的受试者。

[0491] 术语“组合”或“联合”的使用,不限制治疗方案的组分向受试者施用的顺序。因此,本文所述的药物组合物/药物涵盖,在包含本发明的抗原结合受体的转导T细胞施用之前、同时或之后,施用如本文限定的抗体。如本文使用的“组合”或“联合”,也不限制如前述限定的抗体与包含本文限定的抗原结合受体的转导T细胞施用之间的时间安排。因此,两种组分没有同时/并行施用时,施用可以间隔1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时或72小时,或间隔本领域技术人员容易确定的和/或本文所述的任何合适的时间差。

[0492] 在本发明的内容中,术语“组合”或“联合”还包括其中本文限定的抗体和包含根据本发明的抗原结合受体的转导T细胞在施用于受试者之前预先一起孵育的情况。因此,可以在施用前预先孵育两种组分1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟或1小时,或本领域技术人员容易确定的任何合适时间。在另一个优选实施方案中,本发明涉及其中本文限定的抗体和包含本文限定的抗原结合受体的转导T细胞同时/并行施用的治疗方案。在本发明的内容中,可以在已经施用包含抗原结合受体的转导T细胞后,施用本文限定的抗体。

[0493] 此外,本文使用的“组合”或“联合”,并不将所公开的治疗方案局限于以立即的顺序(即,施用两种组分中的一种,(在特定时间间隔后)接着施用另一种,之间不给与和/或实施任何其他治疗方案)施用本文限定的抗体和包含本发明的抗原结合受体的转导T细胞(优选CD8+T细胞)。因此,本发明的治疗方案还包括分开放施用本文限定的抗体分子和包含根据本发明的抗原结合受体的转导T细胞,优选CD8+T细胞,其中所述施用被对于疾病或其症状的治疗或预防所需要的和/或适宜的一个或多个治疗方案隔开。这样的间插治疗方案的实例包括,但不限于,止痛药的施用;化疗剂的施用,疾病或其症状的外科手术操作。因此,本文公开的治疗方案包括,施用本文限定的抗体和包含本文限定的抗原结合受体的转导T细胞,优选CD8+T细胞,不组合施用或组合施用适于疾病或其症状的治疗或预防的一种或多种治疗方案,如本文所述的或本领域已知的。

[0494] 在特别的设想中,通过输注或注射,将所述药物组合物/药物施用于患者。在本发明的内容中,通过输注或注射,将包含本文所述的抗原结合受体的转导T细胞施用于患者。可以通过不同的途径,静脉内、腹膜内、皮下、肌内、局部或皮内施用,来实现合适的组合物/药物的施用。

[0495] 本发明的药物组合物/药物可以进一步包含药学上可接受的载体。合适的药学载体的实例是本领域公知的并且包括磷酸盐缓冲盐水溶液,水,乳液,如油/水乳液,各种类型的润湿剂,无菌溶液等。可以通过公知的常规方法来配制包含这样的载体的组合物。这些药物组合物可以以合适的剂量施用于受试者。剂量方案将由主治医生和临床因素决定。如医学领域中公知的,用于任何一名患者的剂量取决于许多因素,包括患者的大小、身体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、施用时间和途径、一般健康状况、和待并行施用的其他药物。通常,作为药物组合物常规施用的方案应当在每天 $1\mu\text{g}$ 至 5g 单位的范围内。然而,用于连续输注的更优选的剂量可在 $0.01\mu\text{g}$ 至 2mg 的范围内,优选 $0.01\mu\text{g}$ 至 1mg ,更优选 $0.01\mu\text{g}$ 至 $100\mu\text{g}$,甚至更优选 $0.01\mu\text{g}$ 至 $50\mu\text{g}$,且最优选 $0.01\mu\text{g}$ 至 $10\mu\text{g}$ 单位/公斤体重/小时。特别优选的剂量描述于下文中。可以通过定期评估来监控过程。剂量将改变,但用于DNA的静脉内施用的优选剂量大约为DNA分子的 10^6 至 10^{12} 拷贝。

[0496] 本发明的组合物可以局部或全身施用。施用通常将是胃肠外的,例如,静脉内;转导的T细胞还可以针对靶位点施用,例如,通过导管引至动脉中的位点。用于胃肠外施用的制备物包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)和可注射有机酯(如油酸乙酯)。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。胃肠外载体包括氯化钠溶液、Ringer's右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸化Ringer's或非挥发性油。静脉内载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于Ringer's右旋糖的那些)等。防腐剂和其他添加剂也可以存在,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。此外,本发明的药物组合物可以包含蛋白质载体,例如,血清白蛋白或免疫球蛋白,优选人来源的。考虑,除了蛋白质抗体构建体或编码其的核酸分子或载体(如本发明中所述的)和/或细胞,本发明的药物组合物可以进一步包含生物活性剂,这取决于药物组合物的计划用途。这样的物质可能是作用于胃肠系统的药物、作为细胞生长抑制剂(cytostatic)的药物、预防高尿酸血症(hyperurikemia)的药物、抑制免疫反应的药物(例如,皮质类固醇)、作用于循环系统的药物、和/或如本领域已知的诸如T细胞共刺激分子或细胞因子的物质。

[0497] 可以施用本发明的组合物/药物的适应症是恶性疾病,例如上皮、内皮、或间皮来源的癌症和血液癌症,尤其是上皮癌症/癌瘤,例如乳腺癌,结肠癌,前列腺癌,头颈癌,皮肤癌(黑素瘤),泌尿生殖道癌,例如卵巢癌,睾丸癌,内皮癌,宫颈癌和肾癌,肺癌,胃癌,胆管癌,食道癌,唾液腺癌和甲状腺癌,或其他肿瘤疾病,如血液肿瘤,胶质瘤,肉瘤或骨肉瘤。

[0498] 本发明进一步考虑,与其他化合物的共施用方案,所述其它化合物为例如,能够提供激活信号用于免疫效应细胞、用于细胞增殖或用于细胞刺激的分子。所述分子可以例如是用于T细胞的其它主要激活信号(例如,其它共刺激分子:B7家族的分子、Ox40L、4.1BBL、CD40L、抗CTLA-4、抗PD-1),或其它细胞因子白介素(例如,IL-2)。

[0499] 如上所述的本发明的组合物还可以是诊断组合物,其任选进一步包含用于检测的工具和方法。

[0500] 因此,在优选实施方案中,提供了如本文所述的试剂盒、抗原结合受体或转导的T细胞,用作药物。在本发明的内容中,提供了根据本发明的抗原结合受体用作药物,其中在包含和/或表达本文限定的抗原结合受体的转导T细胞(优选CD8+T细胞)施用之前、同时或之后,施用如本文所述的包含突变Fc结构域的一个或多个抗体,并且其中所述T细胞(优选CD8+T细胞)获自待治疗的受试者。所述药物可以用于恶性的治疗方法中,尤其是上皮、内皮或间皮来源或血液的癌症/癌瘤。在本发明的内容中,癌症/癌瘤选自胃肠癌,胰腺癌,胆管细胞癌,肺癌,乳腺癌,卵巢癌,皮肤癌,口腔癌,胃癌,宫颈癌,B和T细胞淋巴瘤,骨髓性白血病,卵巢癌,白血病,淋巴性白血病,鼻咽癌,结肠癌,前列腺癌,肾细胞癌,头颈癌,皮肤癌(黑素瘤),泌尿生殖道癌,例如睾丸癌,卵巢癌,内皮癌,宫颈癌和肾癌,胆管癌,食道癌,唾液腺癌和甲状腺癌,或其他肿瘤疾病,如血液肿瘤,胶质瘤,肉瘤或骨肉瘤。

[0501] 此外,在本发明的内容中,如本文所述的包含突变Fc结构域的抗体结合肿瘤细胞表面上天然产生的肿瘤特异性抗原,其中所述抗体分子在转导T细胞(优选CD8+T细胞)施用之前、同时或之后施用,所述转导T细胞来自所述受试者,包含本文定义的抗原结合受体。在本发明的内容中,癌症/癌瘤选自胃肠癌,胰腺癌,胆管细胞癌,肺癌,乳腺癌,卵巢癌,皮肤癌,口腔癌,胃癌,宫颈癌,B和T细胞淋巴瘤,骨髓性白血病,卵巢癌,白血病,淋巴性白血病,

鼻咽癌,结肠癌,前列腺癌,肾细胞癌,头颈癌,皮肤癌(黑素瘤),泌尿生殖道癌,例如睾丸癌,卵巢癌,内皮癌,宫颈癌和肾癌,胆管癌,食道癌,唾液腺癌和甲状腺癌或其他肿瘤疾病,如血液肿瘤,胶质瘤,肉瘤或骨肉瘤。

[0502] 此外,根据本发明,提供了分子或构建体(即,本文所述的抗体分子)用于胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌的治疗,其中所述分子或构建体包含一个或两个针对/结合/作用于肿瘤抗原(优选人肿瘤相关抗原)(作为肿瘤细胞表面上天然产生的肿瘤特异性抗原)的结合结构域并包含突变Fc结构域,其中本文定义的本发明的抗原结合受体的胞外结构域针对/结合/作用于突变Fc结构域。因此,在本发明的内容中,提供了包含针对/结合/作用于肿瘤相关抗原(优选人肿瘤抗原)的两个结合结构域并包含突变Fc结构域的抗体分子,其中本文定义的本发明的抗原结合受体的胞外结构域针对/结合和作用于突变Fc结构域,所述抗体分子用于上皮、内皮或间皮来源和血液癌症的治疗中。

[0503] 在一个实施方案中,提供了(i)包含两个针对/结合/作用于肿瘤抗原(优选人肿瘤相关抗原)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌的治疗中。

[0504] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对HER1(优选人HER1)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌的治疗中。

[0505] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对HER2(优选人HER2)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于胃癌、乳腺癌和/或宫颈癌的治疗中。

[0506] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对HER3(优选人HER3)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于胃癌和/或肺癌的治疗中。

[0507] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对CEA(优选人CEA)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0508] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对p95(优选人p95)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0509] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对BCMA(优选人BCMA)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0510] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对MSLN(优选人MSLN)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0511] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对MCSP(优选人MCSP)的结合结

构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0512] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对CD19(优选人CD19)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0513] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对CD20(优选人CD20)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于B细胞淋巴瘤和/或T细胞淋巴瘤的治疗中。

[0514] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对CD22(优选人CD22)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于B细胞淋巴瘤和/或T细胞淋巴瘤的治疗中。

[0515] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对CD38(优选人CD38)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0516] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对CD52F1t3(优选人CD52F1t3)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0517] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对Fo1R1(优选人Fo1R1)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0518] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对Trop-2(优选人Trop-2)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于胃肠癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、成胶质细胞瘤和/或口腔癌的治疗中。

[0519] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对CA-125(优选人CA-125)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于卵巢癌、肺癌、乳腺癌和/或胃肠癌的治疗中。

[0520] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对HLA-DR(优选人HLA-DR)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于胃肠癌、白血病和/或鼻咽癌的治疗中。

[0521] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对MUC-1(优选人MUC-1)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和/或胰腺癌的治疗中。

[0522] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对A33(优选人A33)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于结肠癌的治疗中。

[0523] 在一个实施方案中，提供了(i)包含一个或两个针对PSMA(优选人PSMA)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体；和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体，用于前列腺癌的治疗中。

[0524] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对PSCA(优选人PSCA)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0525] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对转铁蛋白受体(优选人转铁蛋白受体)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0526] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对肌腱蛋白(优选人肌腱蛋白)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症的治疗中。

[0527] 在一个实施方案中,提供了(i)包含一个或两个针对CA-IX(优选人CA-IX)的结合结构域和突变Fc结构域的抗体;和(ii)根据本发明的针对/结合/作用于突变Fc结构域的抗原结合受体,用于肾癌的治疗中。

[0528] 示例性实施方案

[0529] 1. 包含锚定跨膜结构域和包含抗原结合部分的胞外结构域的抗原结合受体,其中抗原结合部分能够特异性结合突变的片段可结晶(Fc)结构域但不能特异性结合未突变的亲本Fc结构域,其中与未突变亲本Fc结构域相比,突变Fc结构域包含至少一个氨基酸置换。

[0530] 2. 实施方案1的抗原结合受体,其中与未突变亲本Fc结构域的Fc受体结合相比,突变Fc结构域的Fc受体结合降低,特别是其中Fc受体是Fc γ 受体或新生儿Fc受体(FcRn)。

[0531] 3. 实施方案1或2任一个的抗原结合受体,其中在25℃通过表面等离子体共振(SPR)来测量Fc受体结合。

[0532] 4. 实施方案1至3任一个的抗原结合受体,其中抗原结合部分是scFv、Fab、交叉Fab或scFab。

[0533] 5. 实施方案1至4任一个的抗原结合受体,其中锚定跨膜结构域是选自CD8、CD3z、FCGR3A、NKG2D、CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10或DAP12跨膜结构域或其片段的跨膜结构域。

[0534] 6. 实施方案1至5任一个的抗原结合受体,其中锚定跨膜结构域是CD28跨膜结构域,特别是其中锚定跨膜结构域包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0535] 7. 实施方案1至6任一个的抗原结合受体,进一步包含至少一个刺激信号传导结构域和/或至少一个共刺激信号传导结构域。

[0536] 8. 实施方案1至7任一个的抗原结合受体,其中至少一个刺激信号传导结构域独立地选自CD3z、FCGR3A和NKG2D的胞内结构域,或其片段。

[0537] 9. 实施方案1至8任一个的抗原结合受体,其中至少一个刺激信号传导结构域是CD3z的胞内结构域或其片段,特别是其中至少一个刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0538] 10. 实施方案1至9任一个的抗原结合受体,其中至少一个共刺激信号传导结构域独立地选自CD27、CD28、CD137、OX40、ICOS、DAP10和DAP12的胞内结构域,或其片段。

[0539] 11. 实施方案1至10任一个的抗原结合受体,其中至少一个共刺激信号传导结构域是CD28胞内结构域或其片段,特别是其中至少一个共刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0540] 12. 实施方案1至11任一个的抗原结合受体,其中抗原结合受体包含一个刺激信号传导结构域,其包含CD3z的胞内结构域或其片段,和其中抗原结合受体包含一个共刺激信号传导结构域,其包含CD28的胞内结构域或其片段。

[0541] 13. 实施方案12的抗原结合受体,其中刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列和共刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0542] 14. 实施方案1至13任一个的抗原结合受体,其中胞外结构域连接锚定跨膜结构域,任选通过肽接头。

[0543] 15. 实施方案14的抗原结合受体,其中肽接头包含氨基酸序列GGGGS (SEQ ID NO:17)。

[0544] 16. 实施方案1至15任一个的抗原结合受体,其中锚定跨膜结构域连接共信号传导结构域或信号传导结构域,任选通过肽接头。

[0545] 17. 实施方案1至16任一个的抗原结合受体,其中连接信号传导和/或共信号传导结构域,任选通过至少一个肽接头。

[0546] 18. 实施方案1至17任一个的抗原结合受体,其中抗原结合部分是scFv片段,其中scFv片段在C-末端连接锚定跨膜结构域的N-末端,任选通过肽接头。

[0547] 19. 实施方案1至17任一个的抗原结合受体,其中抗原结合部分是Fab片段或交叉Fab片段,其中Fab或交叉Fab片段在重链的C-末端连接锚定跨膜结构域的N-末端,任选通过肽接头。

[0548] 20. 实施方案7至19任一个的抗原结合受体,其中抗原结合受体包含一个共信号传导结构域,其中共信号传导结构域在N-末端连接锚定跨膜结构域的C-末端。

[0549] 21. 实施方案20的抗原结合受体,其中抗原结合受体另外包含一个刺激信号传导结构域,其中刺激信号传导结构域在N-末端连接共刺激信号传导结构域的C-末端。

[0550] 22. 实施方案1至21任一个的抗原结合受体,其中未突变亲本Fc结构域是IgG1或IgG4Fc结构域,特别是人IgG1 Fc结构域。

[0551] 23. 实施方案1至22任一个的抗原结合受体,其中突变Fc结构域在选自根据EU编号的L234、L235、I253、H310、P331、P329和H435的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是其中氨基酸突变为L234A、L235A、I253A、N297A、H310A、P329G和/或H435A。

[0552] 24. 实施方案1至23任一个的抗原结合受体,其中突变Fc结构域在选自人IgG1 Fc (SEQ ID NO:130) 的残基117、118、136、180、193、212、214和318的位置包含氨基酸置换,特别是其中氨基酸突变是L117A、L118A、I136A、N180A、H193A、P212G、P214G和/或H318A。

[0553] 25. 实施方案1至24任一个的抗原结合受体,其中突变Fc结构域在选自根据EU编号的L234、L235和P329的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是氨基酸突变L234A、L235A和P329G (“PGLALA”）。

[0554] 26. 实施方案1至25任一个的抗原结合受体,其中突变Fc结构域包含根据EU编号的氨基酸突变P329G,其中与未突变亲本Fc结构域的Fc γ 受体结合相比,突变Fc结构域的Fc γ 受体结合降低,特别是其中Fc γ 受体是人Fc γ RIIIa和/或Fc γ RIIa。

[0555] 27. 实施方案1至26任一个的抗原结合受体,其中突变Fc结构域在人IgG1 Fc (SEQ ID NO:130) 的位置212包含氨基酸置换,特别是其中氨基酸突变是P212G。

[0556] 28. 实施方案1至24任一个的抗原结合受体,其中突变Fc结构域在选自根据EU编号

的I253、H310和H435的位置包含至少一个氨基酸突变,特别是氨基酸突变I253A、H310A和H435A(“AAA”),其中与未突变亲本Fc结构域相比,突变Fc结构域的FcRn结合降低。

[0557] 29.实施方案1至24或28任一个的抗原结合受体,其中突变Fc结构域在人IgG1 Fc (SEQ ID NO:130)的位置136、193和318包含氨基酸置换,特别是其中氨基酸突变是I136A、H193A和H318A(“AAA”)。

[0558] 30.实施方案1至27任一个的抗原结合受体,其中至少一个抗原结合部分能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域,其中抗原结合部分包含:

[0559] (i)重链可变结构域(VH),其包含

[0560] (a)重链互补决定区(CDR H)1氨基酸序列RYWMN(SEQ ID NO:1);

[0561] (b)CDR H2氨基酸序列EITPDSSTINYTPSLKD(SEQ ID NO:2);和

[0562] (c)CDR H3氨基酸序列PYDYGAWFAS(SEQ ID NO:3);和

[0563] (ii)轻链可变区(VL),其包含

[0564] (d)轻链互补决定区(CDR L)1氨基酸序列RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:4);

[0565] (e)CDR L2氨基酸序列GTNKRAP(SEQ ID NO:5);和

[0566] (f)CDR L3氨基酸序列ALWYSNHWV(SEQ ID NO:6)。

[0567] 31.实施方案1至27或30任一个的抗原结合受体,其中至少一个抗原结合部分能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域,其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),重链可变区(VH)包含与选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:32的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:33的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0568] 32.实施方案1至27、30或31的抗原结合受体,其中至少一个抗原结合部分包含SEQ ID NO:8的重链可变区(VH)和SEQ ID NO:9的轻链可变区(VL)。

[0569] 33.实施方案1至27或30至32任一个的抗原结合受体,其中至少一个抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv,其中抗原结合受体包含与选自SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:31的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0570] 34.实施方案33的抗原结合受体,包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0571] 35.实施方案1至27或30至32任一个的抗原结合受体,其中至少一个抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的Fab片段,其中抗原结合受体包含

[0572] a)与选自SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:48的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的重链融合多肽;和

[0573] b)与选自SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:50的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的轻链多肽。

[0574] 36.实施方案35的抗原结合受体,其包含

[0575] a)SEQ ID NO:39的重链融合多肽;和

[0576] b)SEQ ID NO:41的轻链多肽。

[0577] 37. 实施方案1至24或28至29任一个的抗原结合受体, 其中至少一个抗原结合部分能够特异性结合包含I253A、H310A和H435A(“AAA”)的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域, 其中抗原结合部分包含:

[0578] (i) 重链可变区(VH), 其包含

[0579] (a) 重链互补决定区(CDR H)1氨基酸序列SYGMS(SEQ ID NO:53)

[0580] (b) CDR H2氨基酸序列SSGGGSY(SEQ ID NO:54); 和

[0581] (c) CDR H3氨基酸序列LGMITTGYAMDY(SEQ ID NO:55); 和

[0582] (ii) 轻链可变区(VL), 其包含

[0583] (d) 轻链互补决定区(CDR L)1氨基酸序列RSSQTIVHSTGHTYLE(SEQ ID NO:56);

[0584] (e) CDR L2氨基酸序列KVSNRFS(SEQ ID NO:57); 和

[0585] (f) CDR L3氨基酸序列FQGSHVPYT(SEQ ID NO:58)。

[0586] 38. 实实施方案1至24、28、29或37任一个的抗原结合受体, 其中至少一个抗原结合部分能够特异性结合包含突变I253A、H310A和H435A(“AAA”)的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域, 其中抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:61的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列, 轻链可变区包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0587] 39. 实实施方案1至24、28、29或37至38任一个的抗原结合受体, 其中至少一个抗原结合部分包含

[0588] a) SEQ ID NO:61的重链可变区(VH); 和

[0589] b) SEQ ID NO:62的轻链可变区(VL)。

[0590] 40. 实实施方案1至24、28、29或37至39任一个的抗原结合受体, 其中至少一个抗原结合部分是能够特异性结合包含突变I253A、H310A和H435A(“AAA”)的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的scFv, 其中抗原结合受体包含与SEQ ID NO:59的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0591] 41. 实实施方案40的抗原结合受体, 其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0592] 42. 实实施方案1至27或30至32任一个的抗原结合受体, 其中至少一个抗原结合部分是能够特异性结合包含P329G突变的突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域的Fab片段, 其中抗原结合受体包含

[0593] a) 与SEQ ID NO:39的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的重链融合多肽; 和

[0594] b) 与SEQ ID NO:41的氨基酸序列为至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的轻链多肽。

[0595] 43. 实实施方案42的抗原结合受体, 其包含

[0596] a) SEQ ID NO:39的重链融合多肽; 和

[0597] b) SEQ ID NO:41的轻链多肽。

[0598] 44. 一种分离的多核苷酸, 其编码实施方案1至43任一个的抗原结合受体。

[0599] 45. 一种分离的多核苷酸, 其编码实施方案1至32、35至39和42至43任一个的抗原结合受体的重链融合多肽或轻链多肽。

- [0600] 46. 一种编码实施方案1至32、35至39和42至43任一个的抗原结合受体的组合物，其包含编码重链融合多肽的第一分离多核苷酸和编码轻链多肽的第二分离多核苷酸。
- [0601] 47. 一种由实施方案44或45任一个的多核苷酸或实施方案46的组合物编码的多肽。
- [0602] 48. 一种载体，特别是表达载体，其包含实施方案44的多核苷酸或实施方案45的多核苷酸。
- [0603] 49. 一种包含实施方案44的多核苷酸、实施方案46的组合物或实施方案48的载体的转导T细胞。
- [0604] 50. 能够表达实施方案1至43任一个的抗原结合受体的转导T细胞。
- [0605] 51. 实施方案49或50任一个的转导T细胞，其中所述转导的T细胞用能够特异性结合靶抗原的T细胞受体(TCR)共转导。
- [0606] 52. 一种试剂盒，其包含
- [0607] (A) 能够表达实施方案1至43任一个的抗原结合受体的转导T细胞；和
- [0608] (B) 包含突变Fc结构域的抗体；
- [0609] 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。
- [0610] 53. 一种试剂盒，其包含
- [0611] (A) 编码实施方案1至43任一个的抗原结合受体的分离多核苷酸；和
- [0612] (B) 包含突变Fc结构域的抗体；
- [0613] 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。
- [0614] 54. 一种试剂盒，其包含
- [0615] (A) 编码实施方案1至43任一个的抗原结合受体的实施方案46的组合物或实施方案48的载体；和
- [0616] (B) 包含突变Fc结构域的抗体；
- [0617] 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。
- [0618] 55. 实施方案52至54任一个的试剂盒，其中未突变亲本Fc结构域是IgG1或IgG4 Fc结构域，特别是人IgG1 Fc结构域。
- [0619] 56. 实施方案52至55任一个的试剂盒，其中与未突变亲本Fc结构域的Fc受体结合相比，突变Fc结构域的Fc受体结合降低，特别是其中Fc受体是Fc γ 受体或新生儿Fc受体(FcRn)。
- [0620] 57. 实施方案56的试剂盒，其中在25°C通过表面等离子体共振(SPR)来测量Fc受体结合。
- [0621] 58. 实施方案52至57任一个的试剂盒，其中突变Fc结构域在选自根据EU编号的L234、L235、I253、H310、P331、P329和H435的位置包含至少一个氨基酸突变，特别是其中氨基酸突变为L234A、L235A、I253A、N297A、H310A、P329G和/或H435A。
- [0622] 59. 实施方案52至58任一个的试剂盒，其中突变Fc结构域在选自根据EU编号的L234、L235和P329的位置包含至少一个氨基酸突变，特别是氨基酸突变L234A、L235A和

P329G (“PGLALA”)。

[0623] 60. 实施方案52至59任一个的试剂盒, 其中突变Fc结构域包含根据EU编号的氨基酸突变P329G。

[0624] 61. 实施方案52至60任一个的试剂盒, 其中突变Fc结构域在选自根据EU编号的I253、H310和H435的位置包含至少一个氨基酸突变, 特别是氨基酸突变I253A、H310A和H435A (“AAA”)。

[0625] 62. 实施方案52至61任一个的试剂盒, 其中包含突变Fc结构域的抗体能够特异性结合肿瘤细胞表面上的抗原, 特别是其中抗原选自FAP、CEA、p95、BCMA、EpCAM、MSLN、MCSP、HER-1、HER-2、HER-3、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52F1t3、FOLR1、Trop-2、CA-12-5、HLA-DR、MUC-1 (粘蛋白)、A33-抗原、PSMA、PSCA、转铁蛋白-受体、TNC (肌腱蛋白) 和CA-IX, 和/或结合人主要组织相容性复合物 (MHC) 分子的肽。

[0626] 63. 实施方案52至62任一个的试剂盒, 其中包含突变Fc结构域的抗体能够特异性结合选自成纤维细胞激活蛋白 (FAP)、癌胚抗原 (CEA)、间皮素 (MSLN)、CD20、叶酸受体1 (FOLR1) 和肌腱蛋白 (TNC) 的抗原。

[0627] 64. 实施方案52至63任一个的试剂盒用作药物。

[0628] 65. 实施方案1至43任一个的抗原结合受体或实施方案49至51任一个的转导T细胞用做药物, 其中在施用包含突变Fc结构域的抗体之前、同时或之后, 施用表达抗原结合受体的转导T细胞, 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0629] 66. 实施方案52至63任一个的试剂盒用于疾病的治疗中, 特别是用于恶性疾病的治疗中。

[0630] 67. 实施方案1至43任一个的抗原结合受体或实施方案49至51任一个的转导T细胞用于恶性的治疗中, 其中治疗包括在施用包含突变Fc结构域的抗体之前、同时或之后, 施用表达抗原结合受体的转导T细胞, 其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0631] 68. 根据实施方案66或67的抗原结合受体、转导T细胞或试剂盒的用途, 其中所述恶性疾病选自上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0632] 69. 根据实施方案66至68的抗原结合受体、转导T细胞或试剂盒的用途, 其中包含突变Fc结构域的抗体能够特异性结合肿瘤细胞表面上的抗原, 特别是其中抗原选自FAP、CEA、p95、BCMA、EpCAM、MSLN、MCSP、HER-1、HER-2、HER-3、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52F1t3、FOLR1、Trop-2、CA-12-5、HLA-DR、MUC-1 (粘蛋白)、A33-抗原、PSMA、PSCA、转铁蛋白-受体、TNC (肌腱蛋白) 和CA-IX, 和/或结合人主要组织相容性复合物 (MHC) 分子的肽。

[0633] 70. 根据实施方案66至69的抗原结合受体、转导T细胞或试剂盒的用途, 其中包含突变Fc结构域的抗体能够特异性结合选自成纤维细胞激活蛋白 (FAP)、癌胚抗原 (CEA)、间皮素 (MSLN)、CD20、叶酸受体1 (FOLR1) 和肌腱蛋白 (TNC) 的抗原。

[0634] 71. 根据实施方案66在70任一个的抗原结合受体、转导T细胞或试剂盒的用途, 其中转导T细胞源自从待治疗受试者分离的细胞。

[0635] 72. 根据实施方案66至70任一个的抗原结合受体、转导T细胞或试剂盒的用途, 其中转导T细胞不是源自从待治疗受试者分离的细胞。

[0636] 73. 一种治疗受试者疾病的方法,包括将能够表达实施方案1至43任一个的抗原结合受体的转导T细胞施用于受试者并且在施用转导T细胞之前、同时或之后施用治疗有效量的包含突变Fc结构域的抗体,其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0637] 74. 实施方案73的方法,还包括从受试者分离T细胞,并通过用实施方案44的多核苷酸、实施方案的组合物或实施方案48的载体转导分离的T细胞来产生转导的T细胞。

[0638] 75. 实施方案74的方法,其中用逆转录病毒或慢病毒载体构建体或用非病毒载体构建体转导T细胞。

[0639] 76. 实施方案75的方法,其中非病毒载体构建体是睡美人迷你环载体。

[0640] 77. 实施方案73至76任一个的方法,其中通过静脉内输注,将转导的T细胞施用于受试者。

[0641] 78. 实施方案73至77任一个的方法,其中在施用于受试者之前,将转导T细胞接触抗CD3和/或抗CD28抗体。

[0642] 79. 实施方案73至78任一个的方法,其中在施用于受试者之前,将转导T细胞接触至少一种细胞因子,优选接触白介素-2(IL-2)、白介素-7(IL-7)、白介素-15(IL-15)和/或白介素-21,或其变体。

[0643] 80. 实施方案73至79任一个的方法,其中疾病是恶性疾病。

[0644] 81. 实施方案73至79任一个的方法,其中疾病选自上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0645] 82. 一种用于诱导靶细胞裂解的方法,包括:在包含突变Fc结构域的抗体的存在下,将靶细胞接触能够表达实施方案1至43任一个的抗原结合受体的转导T细胞,其中抗原结合受体能够特异性结合突变Fc结构域但不能特异性结合未突变亲本Fc结构域。

[0646] 83. 实施方案82的方法,其中靶细胞是癌细胞。

[0647] 84. 实施方案82或83任一个的方法,其中靶细胞表达选自FAP、CEA、p95、BCMA、EpCAM、MSLN、MCSP、HER-1、HER-2、HER-3、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52F1t3、FOLR1、Trop-2、CA-12-5、HLA-DR、MUC-1(粘蛋白)、A33-抗原、PSMA、PSCA、转铁蛋白-受体、TNC(肌腱蛋白)和CA-IX的抗原。

[0648] 85. 实施方案82至84任一个的方法,其中靶细胞表达选自成纤维细胞激活蛋白(FAP)、癌胚抗原(CEA)、间皮素(MSLN)、CD20、叶酸受体1(FOLR1)和肌腱蛋白(TNC)的抗原。

[0649] 86. 实施方案1至43任一个的抗原结合受体、实施方案44和45任一个的多核苷酸或实施方案49至51任一个的转导T细胞的用途,用于药物的制造。

[0650] 87. 实施方案86的用途,其中药物用于恶性的治疗。

[0651] 88. 实施方案86的用途,其中药物用于疾病的治疗。

[0652] 89. 实施方案87的用途,其特征在于所述恶性的疾病选自上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0653] 90. 实施方案88的用途,其特征在于所述疾病选自上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0654] 通过本说明书的描述和实施例公开并包括了这些和其他实施方案。关于根据本发明使用的任一种抗体、方法、用途和化合物,可以使用例如电子设备从公众图书馆和数据库

检索更多文献。例如,可以利用可在互联网上获得的公众数据库“Medline”,例如,http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html。其它数据库和地址,如http://www.ncbi.nlm.nih.gov/、http://www.infobiogen.fr/、http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html、http://www.tigr.org/,是本领域技术人员已知的,并且也可以使用例如http://www.lycos.com获得。

实施例

[0655] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。将理解鉴于以上提供的一般描述,可以实施各种其他实施方案。

[0656] 重组DNA技术

[0657] 使用标准方法来操纵DNA,如Sambrook等,Molecular cloning:A laboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989中所述的。根据制造商的说明使用了分子生物学试剂。关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息在Kabat,E.A.等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication No 91-3242中给出。

[0658] DNA测序

[0659] 通过双链测序测定了DNA序列。

[0660] 基因合成

[0661] 使用合适的模板,通过PCR产生了所需的基因区段,或从通过自动化基因合成产生的合成寡核苷酸和PCR产物由Geneart AG (Regensburg,德国) 来合成。将两侧为单限制性核酸内切酶切割位点的基因区段克隆至标准克隆/测序载体中。从转化的细菌纯化质粒DNA并通过UV光谱测定浓度。通过DNA测序证实了亚克隆的基因片段的DNA序列。用合适的限制性位点来设计基因区段,以允许亚克隆至相应表达载体中。用编码前导肽的5' -端DNA序列来设计所有构建体,所述前导肽使蛋白质靶向在真核细胞中分泌。

[0662] 蛋白质纯化

[0663] 参照标准方案,从过滤的细胞培养物上清液纯化蛋白质。简而言之,将抗体施加于蛋白A琼脂糖柱(GE healthcare) 上并用PBS洗涤。在pH2.8实现抗体的洗脱,接着立即中和样品。通过在PBS中或在20mM组氨酸,150mM NaCl pH6.0中的大小排阻色谱(Superdex 200, GE Healthcare),将聚集的蛋白质与单体抗体分离。将单体抗体级分合并,使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30MWCO) 离心浓缩器浓缩(如果需要),冷冻并储存在-20°C或-80°C。提供部分样品用于随后的蛋白质分析和分析性表征,例如,通过SDS-PAGE和大小排阻色谱(SEC)。

[0664] SDS-PAGE

[0665] 根据制造商的说明使用了NuPAGE® Pre-Cast凝胶系统(Invitrogen)。具体地,使用了10%或4-12% NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast凝胶(pH6.4) 和NuPAGE® MES(还原凝胶,使用NuPAGE® 抗氧化剂跑胶缓冲液添加剂) 或MOPS(非还原凝胶) 跑胶缓冲剂。

[0666] 分析性大小排阻色谱

[0667] 通过HPLC色谱,进行大小排阻色谱(SEC),用于测定抗体的聚集和寡聚状态。简而言之,将蛋白A纯化的抗体施加于Agilent HPLC 1100系统上的300mM NaCl,50mM KH₂PO₄/

K₂HPO₄, pH7.5中的Tosoh TSKgel G3000SW柱、或Dionex HPLC系统上的2×PBS中的Superdex 200柱(GE Healthcare)。通过UV吸光度和峰面积的积分,来定量洗脱的蛋白。将BioRad凝胶过滤标品151-1901用作标准。

[0668] 抗体生产

[0669] 根据国际专利申请公布W02012/130831A1中所述的方法,将Pro329Gly、Leu234Ala和Leu235A1a突变引入恒定区中,以消除与Fc γ受体的结合。将I253A、H310A和H435A(“AAA”)突变引入了恒定区中,以消除与FcRn的结合。使用聚乙烯亚胺,通过用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来产生相应抗体。以1:1比例用重链和轻链的相应表达载体来转染细胞。

[0670] Jurkat NFAT T细胞的慢病毒转导

[0671] 为了生产慢病毒载体,在组成型活性人巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)下,在慢病毒多核苷酸载体中,在框内克隆相应的DNA序列用于抗原结合受体的正确装配。逆转录病毒载体含有土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)、中央多嘌呤区(cPPT)元件、pUC复制起点、和编码促进在细菌中的繁殖和选择的抗生素抗性的基因。

[0672] 为了生产功能性病毒颗粒,使用60-70%汇合的Hek293T细胞(ATCC CRL3216)和含有CAR的载体以及3:1:1:1比例的pCMV-VSV-G:pRSV-REV:pCgpV转移载体,进行了基于Lipofectamine LTX™的转染。收集48h上清液后,在250g下离心5分钟,以除去细胞碎片并通过0.45或0.22μm聚醚砜滤器过滤。使用浓缩的病毒颗粒(Lenti-x-浓缩器,Takara)来转导Jurkat NFAT细胞(Signosis)。使用FACSARIA分选器(BD Bioscience),分选阳性转导的细胞为集合或单克隆。细胞扩增至合适密度后,将Jurkat NFAT T细胞用于实验。

[0673] 实施例1

[0674] 此处描述了Jurkat NFAT T细胞报告分子测定,其中使用表达CD20的SUDHDL4肿瘤细胞作为靶细胞、以及分选的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的集合(图6A)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的集合(图6B)作为靶细胞。将具有P329G LALA突变的GA101 IgG用作IgG,其一方面识别肿瘤抗原,而另一方面被转导的Jurkat NFAT T细胞识别。作为阳性对照,将96孔平板(Cellstar Greiner-bio-one,目录号655185)用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的10μg/ml CD3抗体(来自Biologend®)包被,在4℃过夜或在37℃至少1h。用PBS洗涤CD3抗体包被的孔两次,最后洗涤步骤后,将PBS完全去除。将效应细胞或Jurkat NFAT野生型细胞计数,并且使用Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至1×10⁶活细胞/ml。因此,将细胞悬浮液的合适等分试样在210g在室温(RT)沉淀5min,并重悬浮于新鲜RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax(生长培养基)中。将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至生长培养基中1×10⁶活细胞/ml。将靶细胞和效应细胞以5:1或1:1E:T比例(总共110,000细胞/孔),按一式三份重复,接种于96孔悬浮培养平板(Greiner-bio one)中。作为下一个步骤,使用2ml深孔平板(Axygen®)在生长培养基中制备靶向目标抗原的具有P329G LALA突变的GA101的连续稀释物。为了在每孔最终200ul体积中获得1μg/ml至0.0001μg/ml的终浓度,将不同稀释物的50μl等分试样吸移至相应孔中。此后,将96孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37℃和5%CO₂下孵育。20h孵育后,使用多通道移液器,通过上下吸移10次,将每个孔的内容物混

合。将100 μ l细胞悬浮液转移至新的白色透明底96孔平板(Greiner-bio-one)中,并加入100ul ONE-GloTM萤光素酶测定(Promega)。在旋转振荡器上在300rpm和RT下在黑暗中孵育15min后,使用Tecan® Spark 10M平板阅读器测量了发光,1秒/孔作为检测时间。

[0675] 在以5:1(点)或1:1(方块)比例的靶细胞和效应细胞共孵育20h时,图中显示了,将具有P329G LALA突变的GA101 IgG用作抗体时,表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞以及表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的剂量依赖性激活(图6A和B,用黑色描绘)。如果使用没有P329G LALA突变的GA101 IgG(图6A和B,用灰色描绘),则没有检测到转导的Jurkat NFAT T细胞的激活。每个点表示生物学一式两份重复的平均值,每个作为技术重复进行。所有值描绘为基线校正的值。标准差通过误差条来表示。

[0676] 实施例2

[0677] 此处描述了Jurkat NFAT T细胞报告分子测定,其中使用表达CD20的SUDHL4(图7C和7D)或WSUDLCL2(图7A和7B)肿瘤细胞作为靶细胞、以及表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的单克隆Jurkat NFAT细胞作为效应细胞。将具有P329G LALA突变的GA101 IgG用作IgG,其一方面识别肿瘤抗原,而另一方面被所述Jurkat NFAT T细胞识别。将效应细胞或Jurkat NFAT野生型细胞计数,并且使用Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至 1×10^6 活细胞/ml。因此,将合适等份的细胞悬浮液在210g在室温(RT)沉淀5min,并重悬浮于新鲜RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax(生长培养基)中。将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至生长培养基中 1×10^6 活细胞/ml。将靶细胞和效应细胞以10:1、5:1或1:1E:T比例(总共110,000细胞/孔),按一式三份重复,接种于96孔悬浮培养平板(Greiner-bio one)中。作为下一个步骤,使用2ml深孔平板(Axygen®)在生长培养基中制备靶向目标抗原的具有P329G LALA突变的GA101的连续稀释。为了在每孔最终200ul体积中获得1 μ g/ml至0.0001 μ g/ml的终浓度,将不同稀释度的50 μ l等份试样吸移至相应孔中。此后,将96孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37°C和5%CO₂下孵育。20h孵育后,使用多通道移液器,通过上下吸移10次,将每个孔的内容物混合。将100 μ l细胞悬浮液转移至新的白色透明底96孔平板(Greiner-bio-one)中,并加入100ul ONE-GloTM萤光素酶测定(Promega)。在旋转振荡器上在300rpm和RT下在黑暗中孵育15min后,使用Tecan® Spark 10M平板阅读器测量了发光,1秒/孔作为检测时间。

[0678] 在以10:1(点),5:1(方块)或1:1(三角)比例的靶细胞和效应细胞共孵育20h时,图上显示了,具有P329G LALA的GA101 IgG对表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的剂量依赖性激活(图7A-D,用黑色描绘)。如果使用没有P329G LALA突变的GA101 IgG(图7A-D,用灰色描绘),在1 μ g/ml的最高抗体浓度下,只可检测到转导的Jurkat NFAT T细胞的很少激活。每个点表示技术一式两份重复的平均值。所有值描绘为基线校正的。标准差通过误差条来表示。

[0679] 实施例3

[0680] 在此描述了使用表达FAP的贴壁NIH/3T3-huFAP c1 19肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用分选的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞集合(图8A)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-

CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞集合(图8C),作为效应细胞。将具有P329G LALA突变的FAP 4B9 IgG用作IgG,其一方面识别肿瘤抗原,而另一方面被Jurkat NFAT T细胞识别。包括带有P329G LALA突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。作为阳性对照,将96孔平板(Greiner-bio-one,目录号6555185)孔,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ CD3抗体(来自Biologend®)包被,在37°C至少1h。用PBS洗涤CD3抗体包被的孔两次,最后洗涤步骤后,将PBS完全去除。用PBS洗涤贴壁NIH/3T3-huFAP c1 19靶细胞一次,并使用胰蛋白酶脱壁。将分离的细胞重悬浮于DMEM+4.5g LD-葡萄糖+L-谷氨酰胺+25mM HEPES+10% FCS和1% Glutamax中。将效应细胞或Jurkat NFAT野生型T细胞计数,并且使用Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至 1×10^6 活细胞/ml。因此,将合适等份的细胞悬浮液在210g下在室温(RT)下沉淀5min,并重悬浮于新鲜RPMI-160+10% FCS+1% Glutamax(生长培养基)中。将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至生长培养基中 1×10^6 活细胞/ml。将靶细胞和效应细胞以5:1E:T比例(总共110.000细胞/孔)一式三份重复接种于96孔悬浮培养平板(Greiner-bio one)中。作为下一个步骤,使用2ml深孔平板(Axygen®)在生长培养基中制备靶向目标抗原的具有P329G LALA突变的抗体的连续稀释。为了在每孔最终200ul体积中获得 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 $0.0001\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度,将不同稀释度的 $50\mu\text{l}$ 等分试样吸移至相应的孔中。将96孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37°C和5% CO₂下孵育。20h孵育后,使用多通道移液器,通过上下吸移10次,将每个孔的内容物混合。将100ul细胞悬浮液转移至新的白色透明底96孔平板(Greiner-bio-one)中,并加入100ul ONE-Glo™萤光素酶测定(Promega)。在旋转振荡器上在300rpm和RT下在黑暗中孵育15min后,使用Tecan® Spark 10M平板阅读器测量了发光,1秒/孔作为检测时间。

[0681] 图8B和8D给出,与不同的对照条件相比,与靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ FAP 4B9抗体共孵育的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图8D)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图8B)的数据。

[0682] 与 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ FAP 4B9 P329G LALA孵育时,Jurkat NFAT T细胞(图8B和8D,黑三角)以及仅靶细胞(图8B和8D,倒黑三角)不显示任何可检测的发光信号。

[0683] 此外,与靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ FAP 4B9抗体(图8B和图8D,黑菱形)共孵育时,Jurkat NFAT T细胞也没有显示出萤光信号。而与靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ FAP 4B9抗体共孵育的Jurkat NFAT T细胞的CD3依赖性激活通过可检测的发光信号(白点)证明了其功能性。与靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ FAP4B9抗体共孵育的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的CD3依赖性激活(图8B,白方块)和表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的CD3依赖性激活(图8D,用白方块描绘),显示出全部发光信号中的最高发光信号,因为其组合了CAR介导的激活和CD3介导的激活。用靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ DP47/vk3抗体孵育CAR时,CD3介导的发光信号也是可见的(图8B和图8D,倒白三角)。每个点表示技术的一式三份重复的平均值。所有值描绘为基线校正的。标准差通过误差条来表示。

[0684] 实施例4

[0685] 在此描述了使用表达CEA的贴壁MKN45肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。使用分选的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞集合(图9A)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat

NFAT T细胞集合(图9C)作为效应细胞。使用具有P329G LALA突变的CEA A5B7 IgG或CEA T84LCHA IgG。进一步包括带有P329G LALA突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。

[0686] 作为阳性对照,将96孔平板(Greiner-bio-one,目录号655185)孔,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ CD3抗体(来自Biolegend®),在37°C包被1h。用PBS洗涤CD3抗体包被的孔两次,最后洗涤步骤后,将PBS完全去除。

[0687] 用PBS洗涤贴壁MKN45靶细胞一次,并使用胰蛋白酶分离。将分离的细胞重悬浮于DMEM+4.5g LD-葡萄糖+L-谷氨酰胺+25mM HEPES+10%FCS和1%Glutamax中。

[0688] 将效应细胞或Jurkat NFAT野生型T细胞计数,并且使用Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至 1×10^6 活细胞/ml。因此,将合适等份的细胞悬浮液在210g下在室温(RT)下沉淀5min,并重悬浮于新鲜 RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax(生长培养基)中。

[0689] 将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax中 1×10^6 活细胞/ml。

[0690] 将靶细胞和效应细胞以5:1E:T比例(总共110.000细胞/孔),一式三份重复,接种于96孔悬浮培养平板(Greiner-bio one)中。

[0691] 作为下一个步骤,使用2ml深孔平板(Axygen®)在生长培养基中制备靶向目标抗原的具有P329G LALA突变的抗体的连续稀释。为了在每孔最终200ul体积中获得 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 $0.0001\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度,将不同稀释度的50μl等份试样吸移至相应的孔中。将96孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37°C和5%CO₂下孵育。

[0692] 20h孵育后,使用多通道移液器,通过上下吸移10次,将每个孔的内容物混合。将100μl细胞悬浮液转移至新的白色透明底96孔平板(Greiner-bio-one)中,并加入100ul ONE-Glo™萤光素酶测定(Promega)。在旋转振荡器上在300rpm和RT下在黑暗中孵育15min后,使用Tecan®Spark 10M平板阅读器测量了发光,1秒/孔作为检测时间。

[0693] 在以5:1比例的靶细胞和效应细胞共孵育20h时(图9A和C,点),图显示了,将具有P329G LALA突变的CEA A5B7用作抗体时,表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞以及表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的剂量依赖性激活(图9A和C,灰点)。使用具有P329G LALA突变的CEA T84 LCHA时,只针对表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞显示出剂量依赖性激活(图9A黑点)。然而,使用具有P329 LALA突变的该抗体时,只在 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的最高抗体浓度下,表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的激活才是可检测到的。

[0694] 如果使用具有P329G LALA突变的对照抗体DP47/vk3 IgG(图9A和C,黑三角),没有检测到表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞或表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的激活。每个点表示技术的一式三次重复的平均值。标准差通过误差条来表示。

[0695] 图9B和9D给出,与不同对照条件相比,与靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ CEA T8 LCHA P329G LALA或CEA A5B7 P329G LALA抗体共孵育的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图9B)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图9D)的数据。

[0696] 用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ CEA T8 LCHA P329G LALA孵育时,单独的Jurkat NFAT CAR T细胞(图

9B和9D,黑菱形)以及单独的靶细胞(图9B和9D,白圈)没有显示出任何可检测的发光信号。

[0697] 此外,与靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG(图9B和9D,白方块和白菱形)共孵育时,Jurkat NFAT T细胞也没有显示出可检测的发光信号。而与靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG共孵育的Jurkat NFAT T细胞的CD3依赖性激活通过可检测的发光信号证明了它们的功能性(图9B和D,灰叉号)。

[0698] 用靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG共孵育的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD Jurkat NFAT T细胞的CD3依赖性激活(图9B黑星和灰星)和表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的NFAT T细胞的CD3依赖性激活(图9D,黑星和灰星),显示出全部中最高的发光信号,因为组合了CAR介导的激活和CD3介导的激活。用靶细胞和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ DP47/vk3抗体孵育CAR时,CD3介导的发光信号也是可见的(图9B和图9D,灰加号)。每个点表示技术的一式三次重复的平均值。标准差通过误差条来表示。

[0699] 实施例5

[0700] 在此描述了使用贴壁表达CEA的MKN45肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。作为效应细胞,使用了分选的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞集合(图10C)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞集合(图10A)。使用了CH1A1A 98 99或CEA hMN14 IgG,两者都具有P329G LALA突变。还包括带有P329G LALA突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。

[0701] 作为阳性对照,将96孔平板(Greiner-bio-one,目录号655185)孔,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ CD3抗体(来自 Biolegend®),在37°C包被1h。用PBS洗涤CD3抗体包被的孔两次,最后洗涤步骤后,将PBS完全去除。

[0702] 用PBS洗涤贴壁MKN45靶细胞一次,并使用胰蛋白酶分离。将分离的细胞重悬浮于DMEM+4.5g LD-葡萄糖+L-谷氨酰胺+25mM HEPES+10%FCS和1%Glutamax中。

[0703] 将效应细胞或Jurkat NFAT野生型细胞计数,并且使用Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至 1×10^6 活细胞/ml。因此,将合适等份的细胞悬浮液在210g下在室温(RT)下沉淀5min,并重悬浮于新鲜RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax(生长培养基)中。

[0704] 将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax中 1×10^6 活细胞/ml。

[0705] 将靶细胞和效应细胞以5:1E:T比例(总共110.000细胞/孔)一式三份重复,接种于96孔悬浮培养平板(Greiner-bio one)中。

[0706] 作为下一个步骤,使用2ml深孔平板(Axygen®)在生长培养基中制备靶向目标抗原的具有P329G LALA突变的抗体的连续稀释。为了在每孔最终200ul体积中获得 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 $0.0001\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度,将不同稀释度的50ul等份试样吸移至相应的孔中。将96孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37°C和5%CO₂下孵育。

[0707] 20h孵育后,使用多通道移液器,通过上下吸移10次,将每个孔的内容物混合。将100ul细胞悬浮液转移至新的白色透明底96孔平板(Greiner-bio-one)中,并加入100ul ONE-Glo™萤光素酶测定(Promega)。在旋转振荡器上在300rpm和RT下在黑暗中孵育15min后,使用Tecan®Spark 10M平板阅读器测量了发光,1秒/孔作为检测时间。

[0708] 在5:1比例的靶细胞和表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞共孵育20h时(图10A,黑点和灰点),使用CEA hMN14抗体或CH1A1A 98

99抗体时(图9A和B,灰点),没有检测到激活。表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞在0.1和1 μ g/ml CEA hMN14抗体或CH1A1A 98 99抗体下均显示出很小的激活(图10C黑点和灰点)。

[0709] 如果使用具有P329G LALA突变的对照抗体DP47/vk3 IgG(图10A和C,黑三角),没有检测到表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞或表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的激活。每个点表示技术的一式三次重复的平均值。所有值描述为基线校正的。标准差通过误差条来表示。

[0710] 图10B和10D给出,与不同对照条件相比,与靶细胞和1 μ g/ml CEA hMN14抗体或CH1A1A 98 99抗体共孵育的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图D)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图9D)的数据。

[0711] 所有进行的对照实验均没有显示出任何可检测的发光信号,除了将CD3用作激活刺激物的那些。每个点表示技术的一式三次重复的平均值。标准差通过误差条来表示。

[0712] 实施例6

[0713] 在此描述了使用贴壁表达TNC的CT26TNC c1 19肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。作为效应细胞,使用分选的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞集合(图11C)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞集合(图11A)。将具有P329G LALA突变的TNCA2B10用作IgG。此外,包括带有P329G LALA突变的IgG DP47/vk3作为同种型对照。

[0714] 作为阳性对照,将96孔平板(Greiner-bio-one,目录号655185)的孔,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的10 μ g/ml CD3抗体(来自 Biolegend®),在37°C包被1h。用PBS洗涤CD3抗体包被的孔两次,最后洗涤步骤后,将PBS完全去除。

[0715] 用PBS洗涤贴壁CT26TNC c1 19靶细胞一次,并使用胰蛋白酶分离。将分离的细胞重悬浮于RPMI-1630+10%FCS和1%Glutamax+15 μ g/ml嘌呤霉素中。

[0716] 将效应细胞或Jurkat NFAT野生型T细胞计数,并且使用Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至 1×10^6 活细胞/ml。因此,将合适等份的细胞悬浮液在210g下在室温(RT)下沉淀5min,并重悬浮于新鲜RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax(生长培养基)中。

[0717] 将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至RPMI-1640+10%FCS+1%Glutamax中 1×10^6 活细胞/ml。

[0718] 将靶细胞和效应细胞以5:1E:T比例(总共110.000细胞/孔)一式三份重复,接种于96孔悬浮培养平板(Greiner-bio one)中。

[0719] 作为下一个步骤,使用2ml深孔平板(Axygen®)在生长培养基中制备靶向目标抗原的具有P329G LALA突变的抗体的连续稀释。为了在每孔最终200ul体积中获得1 μ g/ml至0.0001 μ g/ml的终浓度,将不同稀释度的50 μ l等份试样吸移至相应的孔中。将96孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37°C和5%CO₂下孵育。

[0720] 20h孵育后,使用多通道移液器,通过上下吸移10次,将每个孔的内容物混合。将100 μ l细胞悬浮液转移至新的白色透明底96孔平板(Greiner-bio-one)中,并加入100ul ONE-Glo™萤光素酶测定(Promega)。在旋转振荡器上在300rpm和RT下在黑暗中孵育15min

后,使用Tecan® Spark10M平板阅读器测量了发光,1秒/孔作为检测时间。

[0721] 在以5:1比例的靶细胞和效应细胞共孵育20h时(图11A和C,黑点),图显示出,将具有P329G LALA突变的TNC A2B10用作抗体时,表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞以及表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的剂量依赖性激活。如果使用具有P329G LALA突变的对照抗体DP47/vk3 IgG(图11A和C,黑点),没有检测到表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞或表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的激活。每个点表示技术的一式三次重复的平均值。所有值描述为基线校正的。标准差通过误差条来表示。

[0722] 图11B和11D给出,与不同对照条件相比,与靶细胞和1 μ g/ml TNC A2B10共孵育的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图11D)或表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图11B)的数据。

[0723] 与靶细胞和1 μ g/ml IgG共孵育时,Jurkat NFAT T细胞没有显示出任何可检测的发光信号(图11B和图11D,白三角)。而与靶细胞和1 μ g/ml IgG共孵育的Jurkat NFAT细胞的CD3依赖性激活,通过可检测的发光信号证明了其功能性(图11B和图11D,白方块)。

[0724] 与靶细胞和1 μ g/ml IgG共孵育的表达抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的CD3依赖性激活(图11B,白圈)和表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的CD3依赖性激活(图11D,白圈),显示出全部中最高的发光信号,因为组合了CAR介导的激活和CD3介导的激活。用靶细胞和1 μ g/ml DP47/vk3抗体孵育CAR时,CD3介导的发光信号也是可见的(图11B和图11D,黑菱形)。每个点表示技术的一式三次重复的平均值。标准差通过误差条来表示。

[0725] 实施例7

[0726] 在此描述了使用贴壁表达TNC的CT26TNC c119肿瘤细胞作为靶细胞的Jurkat NFAT T细胞报告分子测定。作为效应细胞,使用分选的表达抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的集合(图12A)。将具有P329G LALA突变的TNCA2B10用作IgG。此外,将带有P329G LALA突变的IgG DP47/vk3用作同种型对照。

[0727] 作为阳性对照,将96孔平板(Greiner-bio-one,目录号655185)的孔,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的10 μ g/ml CD3抗体(来自Biologend®),在37°C包被1h。用PBS洗涤CD3抗体包被的孔两次,最后洗涤步骤后,将PBS完全去除。

[0728] 用PBS洗涤贴壁CT26TNC c1 19靶细胞一次,并使用胰蛋白酶分离。将分离的细胞重悬浮于RPMI-1630+10%FCS和1%Glutamax+15 μ g/ml嘌呤霉素中。

[0729] 将效应细胞或Jurkat NFAT野生型细胞计数,并且使用Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至 1×10^6 活细胞/ml。因此,将合适等份的细胞悬浮液在210g下在室温(RT)下沉淀5min,并重悬浮于新鲜RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax(生长培养基)中。

[0730] 将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至RPMI-1640+10%FCS+1%Glutamax中 1×10^6 活细胞/ml。

[0731] 将靶细胞和效应细胞以5:1E:T比例(总共110.000细胞/孔)一式三份重复接种于96孔悬浮培养平板(Greiner-bio one)中。

[0732] 作为下一个步骤,使用2ml深孔平板(Axygen®)在生长培养基中制备靶向目标抗原的具有P329G LALA突变的抗体的连续稀释。为了在每孔最终200ul体积中获得1 μ g/ml至0.0001 μ g/ml的终浓度,将不同稀释度的50 μ l等份试样吸移至相应的孔中。将96孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37℃和5%CO₂下孵育。

[0733] 20h孵育后,使用多通道移液器,通过上下吸移10次,将每个孔的内容物混合。将100 μ l细胞悬浮液转移至新的白色透明底96孔平板(Greiner-bio-one)中,并加入100ul ONE-Glo™萤光素酶测定(Promega)。在旋转振荡器上在300rpm和RT下在黑暗中孵育15min后,使用Tecan®Spark10M平板阅读器测量了发光,1秒/孔作为检测时间。

[0734] 在以5:1比例的靶细胞和效应细胞共孵育20h时(图12A,黑点),图显示出,从0.01 μ g/ml的具有P329G LALA突变的TNC A2B10开始,表达抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的剂量依赖性激活。如果使用具有P329G LALA突变的对照抗体DP47/vk3 IgG(图12A和C,灰点),没有表达抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的激活可检测到。每个点表示技术的一式三次重复的平均值。所有值描述为基线校正的。标准差通过误差条来表示。

[0735] 图12B给出,与不同对照条件相比,与靶细胞和1 μ g/ml TNC A2B10抗体共孵育的表达抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞的数据。

[0736] 用靶细胞但没用抗体孵育的表达抗-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD的Jurkat NFAT T细胞(图12B,黑方块)、以及用靶细胞和1 μ g/ml TNC A2B10抗体孵育的Jurkat NFAT细胞(图12B,白点),没有显示出可检测的发光信号。而在CD3包被的孔中接种的、与靶细胞和1 μ g/ml TNC A2B10共孵育的Jurkat NFAT细胞,显示出明显的发光信号。

[0737] 此外,在CD3包被的孔中,用靶细胞和1 μ g/ml TNC A2B10或1 μ g/ml DP47/vk3抗体孵育的表达抗-P329G--CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD Fab的Jurkat NFAT T细胞,显示出高的发光信号。每个点表示技术的一式三次重复的平均值。标准差通过误差条来表示。

[0738] 实施例8

[0739] 在此描述了Jurkat NFAT T细胞报告分子测定,其中使用表达CD20的SUDHDL4肿瘤细胞作为靶细胞、和表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD(图13A)或抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD(图13B)的Jurkat NFAT T细胞集合作为效应细胞。将具有P329 LALA、D265A P329G突变,仅LALA突变或无突变的GA101 IgG用作IgG,其一方面识别肿瘤抗原,而另一方面被Jurkat NFAT T细胞识别。将效应细胞计数,并且使用Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至1×10⁶活细胞/ml。将合适等份的细胞悬浮液在210g下在室温(RT)下沉淀5min,并重悬浮于新鲜RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax中。将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至生长培养基中1×10⁶活细胞/ml。将靶细胞和效应细胞以5:1E:T比例(总110.000细胞/孔)一式三份重复接种于96孔悬浮培养平板(Greiner-bio one)中。作为下一个步骤,使用2ml深孔平板(Axygen®)在生长培养基中制备靶向目标抗原的不同抗体的连续稀释。为了在每孔最终200ul体积中获得1 μ g/ml至10pg/ml的终浓度,将不同稀释度的50 μ l等份试样吸移至各自的孔中。将96孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37℃和5%CO₂下孵育。20h孵育后,使用多通道移液器,通过上下吸移10次,将每

个孔的内容物混合。将100 μ l细胞悬浮液转移至新的白色透明底96孔平板(Greiner-bio-one)中,并加入100 μ l ONE-Glo™萤光素酶测定(Promega)。在旋转振荡器上在300rpm和RT下在黑暗中孵育15min后,使用 Tecan® Spark10M平板阅读器测量了发光,1秒/孔作为检测时间。图显示出,只有使用带有P329G突变或P329G和LALA突变(而非仅LALA突变)的抗体时,才有靶细胞的剂量依赖性激活。此外,如果使用GA101野生型抗体,没有效应细胞的激活可检测到。

[0740] 实施例9

[0741] 在此描述了Jurkat NFAT T细胞报告分子测定,其中使用表达CD20的SUDHDL4肿瘤细胞作为靶细胞、和表达抗-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD(图14A)或抗-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD(图14B)的Jurkat NFAT T细胞集合作为效应细胞。将具有P329 LALA、单独的P329G突变、仅有LALA突变或无突变的GA101 IgG用作IgG,其一方面识别肿瘤抗原,而另一方面被Jurkat NFAT T细胞识别。将效应细胞计数,并且使用 Cedex HiRes检查其生活力。将细胞数调节至 1×10^6 活细胞/ml。将合适等份的细胞悬浮液在210g下在室温(RT)下沉淀5min,并重悬浮于新鲜RPMI-160+10%FCS+1%Glutamax中。将表达目标抗原的靶细胞计数并且也检查其生活力。与针对效应细胞描述所类似,将细胞数调节至生长培养基中 1×10^6 活细胞/ml。将靶细胞和效应细胞以5:1E:T比例(总共110.000细胞/孔)一式三份重复接种于384孔平板中。作为下一个步骤,使用96孔平板在生长培养基中制备靶向目标抗原的不同抗体的连续稀释。为了在每孔最终30 μ l体积中获得1 μ g/ml至10pg/ml的终浓度,将不同稀释度的10 μ l等份试样吸移至各自的孔中。将384孔平板在190g和RT下离心2min。用Parafilm®密封,将平板在潮湿的气氛中在37℃和5%CO₂下孵育。20h孵育后,加入6 μ l ONE-Glo™萤光素酶测定(Promega),并立即使用Tecan® Spark10M平板阅读器进行了读出,1秒/孔作为检测时间。图显示出,只有使用带有P329G突变或P329G和LALA突变(而非仅LALA突变)的抗体时,才有靶细胞的剂量依赖性激活。此外,如果使用GA101野生型抗体,没有效应细胞的激活可检测到。

[0742] 示例性序列

[0743] 表2:抗-P329G-ds-scFv氨基酸序列:

构建体	氨基酸序列	SEQ ID NO
抗 P329G CDR H1 Kabat	RYWMN	1
抗 P329G CDR H2 Kabat	EITPDSTINYTPSLKD	2
抗 P329G CDR H3 Kabat	PYDYGAWFAS	3
抗 P329G CDR L1 Kabat	RSSTGAVTTSNYAN	4
抗 P329G CDR L2 Kabat	GTNKRAP	5
抗 P329G CDR L3	ALWYSNHWV	6

Kabat		
抗 P329G-ds-scFv-CD28 ATD-CD28CSD- CD3zSSD 融合物 pETR17096	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFDFSRWWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVSAGGGSGGGSGGGSGGGGSQAVVTQESALT SPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGCGTKLTVLGGGSFWVLVVGGVLA CYSLLVTVAIFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	7
抗 P329G-ds VH	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFDFSRWWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVSA	8
抗 P329G-ds VL	QAVVTQESALTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPDLFTGLIGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALT TGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGCGTKLTVL	9
抗 P329G-ds-scFv [0745]	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFDFSRWWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVSAGGGSGGGSGGGSGGGGSQAVVTQESALT SPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGCGTKLTVL	10
CD28ATD	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAIFIIFWVRSKRSRLLHSD YMNMTTPRRGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNENLGRREYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	11
CD28CSD	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS YRS	12
CD3zSSD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNENLGRREYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	13
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAIFIIFWVRSKRSRLLHSD YMNMTTPRRGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNENLGRREYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	14
eGFP	VSKGEELFTGVVPILVELGDVNNGHKFSVSGEGEDAT YGKLTALKFICTTGKLPWPWTLLTYGVQCFSRYPDH MKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKF EGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYI MADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIG DGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMVLEFVTA	15

	AGITLGMDELYK	
[0746]	(G4S)4 接头	GGGGSGGGSGGGGGGGGS
	G4S 接头	GGGGS
	T2A 接头	GEGRGSLLTCDVVEENPGP

[0747] 表3:抗P329G-ds-scFv DNA序列:

构建体	DNA 序列	SEQ ID NO
抗 P329G-ds-scFv-CD28 ATD-CD28CSD- CD3zSSD 融合物 pETR17096	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAAC AGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGGA GAGCGCGGCCGCTGGTGCAGCCGGCGCAGCCT GAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAG CAGGTACTGGATGAACGGTGAGGCAGGCCCGG CAAGTGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCCGA CAGCAGCACCATCAACTACACCCCCCAGCCTGAAGGA CAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGGAGCGAGGA CACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCTACGACTAC GGCGCCTGGTTGCCAGCTGGGCCAGGGCACCCCTG GTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTGG CGGGGAAAGCGGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCG GATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGA CCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCCTGACCTGCA GGAGCAGCACCGCGCCGTGACCACCAAGCAACTACG CCAACCTGGGTGCAGGAGAACCCGACCAACCTGTTCA CCGGCCTGATCGCGGCCAGGTTCAAGCGGAGGCCCTGATCGCG GCGTGCCGCCAGGTTCAAGCGGAGGCCCTGATCGCG ACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCCAGACCG AGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAG CAACCACTGGGTGTTCGGCTGTGGCACCAAGCTGAC CGTGTGGAGGGGGCGGATCCTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCT GGTGACCGTGGCCTCATCTTCTGGGTGAGGGAGC AAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC ATGACCCCCAGGAGGCCGGCCCCACCAAGGAAGCAC TACCAAGCCCTACGCCCTACCGGCCAGGGACTTCGCC ACAGGAGCAGGGTAAGTTCAGCAGGAGCGCCGAC GCCCGCCCTACCAAGCAGGGCCAGAACAGCTGTATA ACGAGCTGAACCTGGCAGGAGGGAGGAGTACGAC GTGCTGGACAAGAGGAGGGCAGGGACCCCGAGAT GGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGGAGG GCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGCCG AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGA	19

[0748]

[0749]

	GGAGGGGCAAGGCCACGACGCCCTGTACCAGGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGG	
抗 P329G-ds VH	GAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGCGCGCGCGCTGGTG CAGCCCGCGCGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTACTGGATGAACCTGG GTGAGGCAGGCCCGCAAGTGTCTGGAGTGGATC GGCAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAACTAC ACCCCCAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGG GACAACGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGATC AAGGTGAGGAGCGAGGACACGCCCTGTACTACTGC GTGAGGCCCTACGACTACGGCGCTGGTTCGCCAGCT GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCC	20
抗 P329G-ds VL	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGACCAAC AGCCCCGGCGAGACCGTGACCCCTGACCTGCAGGAGC AGCACCGCGCCGTGACCACCAAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGGAGAAAGCCGACCACTGTTACCGGC CTGATCGCGGGCACCAACAAGAGGGCCCCGGCGTG CCCGCCAGGTTCAGCGGCAGCCTGATCGCGACAAG GCCGCCCTGACCATCACCGCGCCAGACCGAGGGAC GAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCAACC ACTGGGTGTTCGGCTGTGGCACCAAGCTGACCGTGC TG	21
抗 P329G-ds-scFv	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTGGTAGCAAC AGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG GAGCGCGGGCGGCCCTGGTGCAAGCCCGCGCAGCCT GAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAG CAGGTACTGGATGAACGGGTGAGGCAGGCCCG CAAGTGTCTGGAGTGGATCGCGAGATCACCCCGA CAGCAGCACCATCAACTACACCCCGAGCCTGAAGGA CAAGTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGGAGCGAGGA CACCGCCCTGTACTACTGCCTGAGGCCCTACGACTAC GGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGCCAGGGCACCTG GTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTGG CGGGGAAAGCGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCG GATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGA CCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCCTGACCTGCA GGAGCAGCACCGCGCCGTGACCAAGCACAGCAACTACG CCAACGGGTGCAGGAGAAAGCCGACCCACCTGTTCA CCGGCCTGATCGCGGGCACCAACAAGAGGGCCCCG GCGTGCCCGCCAGGTTCAGCGGCAGCCTGATCGCG ACAAGGCCCTGACCATCACCGCGCCAGACCG AGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAG CAACCACTGGGTGTTCGGCTGTGGCACCAAGCTGAC	22

[0750]	IRES EV71, 内部核糖体进入位点	CGTGC CCCGAAGTAACCTAGAACGCTGTAAATCAACGATCAAT AGCAGGGTGTGGCACACCAGTCATACCTTGATCAAGCA CTTCTGTTCCCCGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCG CGCGGCTGAAGGAGAAAACGTTCGTACCCGACCAA CTACTTCGAGAAGCTTAGTACCAACATGAACGAGGC GGGTGTTCGCTCAGCACAACCCCAGTGTAGATCAGG CTGATGAGTCAGTCACTGCAACCCCCATGGCGACCATGGC AGTGGCTCGTGGCGGCCATGGAGAAATCCA TGGGACGCTCTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTA TTGAGCTAACGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGATTGCGG CTAACCTAACTGCGGAGCACATGCTCACAAACAGT GGGTGGTGTGCGTAACGGCAACTCTGCAGCGAA CCGACTACTTGGGTGTCCGTGTTCTTTATTCTTAT ATTGGCTGCTTATGGTACAATCAAAAGTTGTACC ATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACAGG GCAACTGTTACCTATTGTTGGTGTACCAATTCA CTGAAGTCTGTGATCACTCTCAAATTCAATTGACCC CAACACAATCAAAC	23
	CD28ATD	TTTGGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCT GGGTG	24
	CD28CSD	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGAATAC ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCGCA AGCATIACCAGCCTATGCCACCACCGCACTCGC AGCCTATCGCTCC	25
	CD3zSSD	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG TACCACGAGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGACCTGAGATGGGGGGAAA GCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAACTCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG TGAGATTGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAA GGGGCACGATGGCCTTACAGGGTCTCAGTACAGCC ACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCC CTGCCCTCGC	26
	CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	TTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGCGCGTGTGGCCT GCTACAGCCTGCTGGTACCGTGGCCTCATCATCTT CTGGGTGAGGAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACA GCGACTACATGAACATGACCCCCAGGAGGCCCGCC CCACCAGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCGCC GGGACTTCGCCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTCA GCAGGAGCGCCACGCCCGCCTACCAAGCAGGCC AGAACCAAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGA GGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGC	27

	AGGGACCCCGAGATGGCGGCAAGCCCAGGAGGAA GAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAA GGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCAT GAAGGGCGAGAGGAGGAGGGCAAGGGCACGACG GCCTGTACCAGGCCTGAGCACCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAG G	
T2A 元件	TCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGT GACGTGGAGGAGAATCCCGCCCTAGG	28
eGFP	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTG CCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCA CCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGT GACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTCAGCCG CTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAG TCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACC ATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC GGCAACATCCTGGGGACAAGCTGGAGTACAACACTAC AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGA AGAACGGCATCAAGGTGAACITCAAGATCCGCCACA ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACT ACCAGCAGAACACCCCCATCGCGACGGCCCCGTGC TGCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAGTCCG CCCTGAGCAAAGACCCAACGAGAAGCGCGATCACA TGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGATCAC TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA	29
[0751]		
抗 P329G-ds-scFv-CD28 ATD-CD28CSD- CD3zSSD- eGFP 融 合 物 pETR17096	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTGGTAGCAAC AGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGGA GAGCGCGGCGGGCTGGTGCAGCCCGCGGCAGCCT GAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAG CAGGTACTGGATGAACCTGGGTGAGGCAGGCCCGG CAAGTGTCTGGAGTGGATCGCGAGATCACCCCCGA CAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGGA CAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGGA CACCGCCCTGTACTACTGCCTGAGGCCCTACGACTAC GGCGCCCTGGTTCGCCAGCTGGGCCAGGGCACCTG GTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTGG CGGGGGAAGCGGGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCG GATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGA CCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCCTGACCTGCA GGAGCAGCACCGCGCCGTGACCACCAAGCAACTACG	30

[0752]	<p>CCAACTGGGTGCAGGAGAACGCCGACCAACCTGTTCA CCGGCCTGATCGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCG GCGTGCCTGCCAGGTTCAGCGGCAGCCTGATCGCG ACAAGGCCGCCCTGACCATCACGGCGCCCAGACCG AGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAG CAACCACTGGGTGTTCGGCTGTGGCACCAAGCTGAC CGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCGTGTGGCCTGCTACAGCCTGCT GGTGACCGTGGCCTCATCATCTCTGGGTGAGGAGC AAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC ATGACCCCCAGGAGGCCGCCACCAGGAAGCAC TACCAGCCCTACGCCCCCCCCCAGGGACTTCGCCCT ACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAAGCAGGAGCGCCGAC GCCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAAGCTGTATA ACGAGCTGAACCTGGCAGGAGGGAGGTACGAC GTGCTGGACAAGAGGAGGGCAGGGACCCCGAGAT GGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCCAGGAGG GCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGCCG AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGA GGAGGGGCAAGGGCACGACGGCTGTACCAAGGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCTCAGGTCCGGAGAGGGCA GAGGAAGTCTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGA ATCCCGGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCAGCTGGACG GCGACGTAACGCCACAAGTTCAAGCGTGTCCGGCG AGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCC TGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCC CTGGCCCACCCCTCGTACCACCCCTGACCTACGGCGT CAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAG CACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACG TCCAGGAGCGCACCATCTTCAAGGACGACGGCA ACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG ACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCACAAGC TGGAGTACAACACAAGCCACAACGTCTATATCAT GGCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCT CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCA GCTCGCCGACCAACTACCAGCAGAACACCCCCATCG CGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAACTACCT GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGA GAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA AGTGA</p>	
--------	--	--

[0753] 表4:抗P329G-scFv氨基酸序列:

构建体	氨基酸序列	SEQ ID NO
抗 P329G CDR H1 Kabat	参见表 2	1
抗 P329G CDR H2 Kabat	参见表 2	2
抗 P329G CDR H3 Kabat	参见表 2	3
抗 P329G CDR L1 Kabat	参见表 2	4
抗 P329G CDR L2 Kabat	参见表 2	5
抗 P329G CDR L3 Kabat	参见表 2	6
抗 P329G-scFv- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD 融合物	EVKLLESGGLVQPGGSLKLSKAASGFDFSRWWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVSAGGGGSGGGGSAGGGGGSQAVVTQESALTT SPGETVLTCSRSGAVTSNYANWVQEKPDLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWFVGGGTKLTVLGGGGSFWVLVVVGVL CYSLLVTVAIFIWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	31
抗 P329G VH	EVKLLESGGLVQPGGSLKLSKAASGFDFSRWWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVSA	32
抗 P329G VL	QAVVTQESALTTSPGETVLTCSRSGAVTSNYANWV QEKPDLFTGLIGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALT TGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVGGGTKLTVL	33
抗 P329G-scFv	EVKLLESGGLVQPGGSLKLSKAASGFDFSRWWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVSAGGGGSGGGSGGGGGGGSQAVVTQESALTT SPGETVLTCSRSGAVTSNYANWVQEKPDLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWFVGGGTKLTVL	34
CD28ATD	参见表 2	11
CD28CSD	参见表 2	12
CD3zSSD	参见表 2	13
CD28ATD-CD28CDS- CD3zSSD	参见表 2	14

[0754]

[0755]	eGFP	参见表 2	15
	(G4S)4 接头	参见表 2	16
	G4S 接头	参见表 2	17
	T2A 接头	参见表 2	18

[0756] 表5:抗P329G-scFv DNA序列:

构建体	DNA 序列	SEQ ID NO
抗 P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD 融合物	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAAC AGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGGA GAGCGGCCGGCGGCCCTGGTGCAGCCCCGGCAGCCT GAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAG CAGGTACTGGATGAACGGGTGAGGCAGGGCCCCGG CAAGGGTCTGGAGTGGATCGCGAGATCACCCCCGA CAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGGA CAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAACAC CCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGGA CACCGCCCTGTACTACTGCCTGAGGCCCTACGACTAC GGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGCCAGGGCACCTG GTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTGG CGGGGAAAGCGGCCGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCG GATCTCAGGCCGTGGTACCCAGGAGAGCGCCCTGA CCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCCTGACCTGCA GGAGCAGCACCGCGCCGTGACCACCAACTACG CCAACCTGGGTGCAGGAGAACCCGACCACCTGTTCA CCGGCCTGATCGCGGCCACCAACAAGAGGGCCCCG GCGTGCCGCCAGGTTCAAGCGGCAGCCTGATCGCG ACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCCAGACCG AGGACGAGGCCATCTACTCTGCCTGTTGAG CAACCACTGGGTGTTCCGGCGGTGGCACCAAGCTGAC CGTGCCTGGAGGGGGCGGATCCTCTGGTGCTGGT GGTGGTGGCGGCCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCT GGTACCGTGGCCTCATCATCTGGTGAGGAGC AAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC ATGACCCCCAGGAGGCCGGCCCCACCAAGGAAGCAC TACCAACCTACGCCCTACCGGCCCTACGGACTTCGCC ACAGGAGCAGGGTAAGTCAGCAGGAGCGCCGAC GCCCGCCCTACCAAGCAGGGCCAGAACCAAGCTGTATA ACGAGCTGAACCTGGCAGGAGGGAGGAGTACGAC GTGCTGGACAAGAGGAGGGCAGGGACCCCGAGAT GGCGGCCAGGCCAGGAGGAAGAACCCCCAGGAGG GCCTGTATAACGAGCTGCAGAACAGATGCCG AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGA GGAGGGCAAGGGCACGACGGCCTGTACCAAGGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCTAGG	35
[0757]		

[0758]	抗 P329G VH	GAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGCGGCCCTGGTG CAGCCCGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTACTGGATGAACCTGG GTGAGGCAGGCCCGCAAGGGCTGGAGTGGATC GGCGAGATCACCCCCGACAGCAGCACCATCAACTAC ACCCCCAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGG GACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGATC AAGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGC GTGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCT GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCC	36
	抗 P329G VL	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGACCA AGCCCCGGCGAGACCGTGACCCCTGACCTGCAGGAGC AGCACCGCGCCGTGACCACCACTACGCCAAC TGGGTGAGGAGAAAGCCCACCCACCTGTTACCGGC CTGATCGCGGGCACCAACAAGAGGGCCCCGGCGTG CCCGCCAGGTTCAGCGGCAGCCTGATCGCGACAAG GCCGCCCTGACCATCACCGCGCCAGACCGAGGAC GAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCAACC ACTGGGTGTTCGCGGGTGGCACCAAGCTGACCGTGC TG	37
	CD28ATD	参见表 3	24
	CD28CSD	参见表 3	25
	CD3zSSD	参见表 3	26
	CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	参见表 3	27
	T2A 元件	参见表 3	28
	eGFP	参见表 3	29
抗 P329G-scFv-CD28AT D-CD28CSD- CD3zSSD- eGFP 融合物		ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTGGTAGCAAC AGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGGA GAGCGCGGCCGCGCTGGTGCAGCCCGCGCAGCCT GAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAG CAGGTACTGGATGAACGGGTGAGGCAGGCCCCGG CAAGGGTCTGGAGTGGATCGCGAGATCACCCCCGA CAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAGGA CAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGGA CACCGCCCTGTACTACTGCCTGAGGCCCTACGACTAC GGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGCCAGGGCACCTG GTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGTGG CGGGGAAAGCGGGGGGGTGGCAGCGGAGGGGGCG GATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGA CCACCAGCCCCGGCAGACCGTGACCCCTGACCTGCA GGAGCAGCACCGCGCCGTGACCACCAAGCAACTACG CCAACCTGGGTGCAGGAGAAAGCCCACCCACCTGTTCA CCGGCCTGATCGCGGGCACCAACAAGAGGGCCCCG	38

[0759]	GCGTGCCGCCAGGTTCAGCGGCAGCCTGATGGCG ACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCCAGACCG AGGACGAGGCCATCTACTCTCGCCCTGTGGTACAG CAACCACGGGTGTTCGCGGGTGGCACCAAGCTGAC CGTCTGGGAGGGGGCGGATCCTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCGTGTGGCCTGCTACAGCCTGCT GGTGACCGTGGCCTCATCATCTGGGTGAGGAGC AAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC ATGACCCCCAGGAGGCCGGCCCCACCAGGAAGCAC TACCAGCCCTACGCCCTCCCCCAGGGACTCGCCGCCT ACAGGAGCAGGGTAAGTTCAGCAGGAGCGCCGAC GCCCGCCTACCAGCAGGGCAGAACAGCTGTATA ACGAGCTGAACCTGGCAGGAGGGAGGTACGAC GTGCTGGACAAGAGGAGGGCAGGGACCCCAGAT GGCGCGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGGAGG GCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGCCG AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGA GGAGGGCAAGGCCACGACGGCCTGTACCAAGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCTCAGGTCCGGAGAGGGCA GAGGAAGTCTCTAACATCGGTGACGTGGAGGAGA ATCCCGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT TCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCAGCTGGACG GCGACGTAACGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCG AGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCC TGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCC CTGGCCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGT CAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAG CACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACG TCCAGGAGCGCACCATCTCTCAAGGACGACGGCA ACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG ACACCCCTGGTAACCGCATTGAGCTGAAGGGCATCG ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCACAAGC TGGAGTACAACATACAACAGCCACAACGTCTATATCAT GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCT CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCA GCTCGCCGACCAACTACCAGCAGAACACCCCCATCG CGACGGCCCGTGTGCTGCCGACAACCCACTACCT GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGA GAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA AGTGA	
--------	--	--

[0760] 表6:抗P329G-ds-Fab氨基酸序列

构建体	氨基酸序列	SEQ ID NO
-----	-------	-----------

抗 P329G CDR H1 Kabat	参见表 2	1
抗 P329G CDR H2 Kabat	参见表 2	2
抗 P329G CDR H3 Kabat	参见表 2	3
抗 P329G CDR L1 Kabat	参见表 2	4
抗 P329G CDR L2 Kabat	参见表 2	5
抗 P329G CDR L3 Kabat	参见表 2	6
抗 P329G-ds-Fab- 重 链 - CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD 融合物 pETR17100	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSACAASGFDFSRYWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGFW VLVVVGGVLACYSLLVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	39
抗 P329G-ds-Fab 重链	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSACAASGFDFSRYWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	40
抗 P329G-ds-Fab 轻链	QAVVTQESALTTSPGETVLTCSRSTGAVTTSNYANWV QEKPDLHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFVFCGTLVRLRTVA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	41
抗 P329G-ds VL	参见表 2	9
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	42
抗 P329G-ds VH	参见表 2	8
CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	43
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	参见表 2	14

[0763] 表7:抗P329G-ds-Fab DNA序列:

构建体	DNA 序列	SEQ ID NO
抗 P329G-ds-Fab-重链 - CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD 融合物 pETR17100 [0764]	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAAC AGCTACGGGTGTGCATTCCCAGGCCGTGGTAGACCCA GGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACCGT GACCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGCGCCGTGAC CACCACTACGCCAAGTGGGTGCAGGAGAACCC CGACCACCTGTTACCGGCCTGATGGCGGCACCAA CAAGAGGGCCCCCGCGTGCCGCCAGGTTAGCGG CAGCCTGATGGCGACAAGGCCGCCCCGATCAC CGGCGCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTCTG CGCCCTGTTACAGCAACCAACTGGGTGTTGGCTGT GGCACCAAGCTGACCGTGTGCGTACGGTGGCTGCA CCATCTGTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTCGCTGTAAT AACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG GTGGATAACGCCCTCCAATGGGTAACTCCCAGGAGA GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCA ACAGGGGAGAGTGTAGGAATCCCCGAAGTAACCTT AGAAGCTGTAATCAACGATCAATAGCAGGTGTGGCA CACCAAGTCATACCTTGATCAAGCACTCTGTTCCCC GGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGGGCTGAAGG AGAAAACGTTGTTACCCGACCAACTACTTCGAGAA GCTTAGTACCAACATGAACCGAGGCAGGGTGTTCGCT CAGCACAAACCCAGTGTAGATCAGGCTGATGAGTCA CTGCAACCCCATGGCGACCATGGCAGTGGCTGCGT TGGCGGCCTGCCATGGAGAAATCCATGGGACGCTCT AATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTATTGAGCTAACT GGTAGTCCTCCGGCCCTGATTGCGGCTAATCCTAAC TGCAGCACATGTCACAAACCAAGTGGGTGGTGT TCGTAACGGCAACTCTGCAGCGAACCGACTACTTT GGGTGTCCGTGTTCCCTTATTCTATATTGGCTGCTT ATGGTGACAATCAAAAGTGTACCATATAGCTAATG GATTGGCCATCCGGTGTGCAACAGGGCAACTGTTAC CTATTTATTGGTTTGTAACATTATCACTGAAGTGTG ATCACTCTCAAATTCAATTGACCCCTAACACAATCAA ACGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGT GTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCCGAGGTGAAG CTGCTGGAGAGCGGGCGGCGGCCGTGGTGAGCCCGC GGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTC GACTTCAGCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAG	44

[0765]	GCCCCCGCAAGTGTCTGGAGTGGATCGCGAGATC ACCCCGACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGC CTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGG AGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCT ACGACTACGGCGCCTGGITCGCCAGCTGGGCCAGG GCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACCAAGG GCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGA GCACCAGCGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCC GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTT CCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTCTAGCAGCCTGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCAA GAGCTCGGAGGGGGCGGATCCTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGCGGGCGTGCCTGCTACAGCCTGCT GGTACCGTGGCCTTCATCATCTCTGGGTGAGGAGC AAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC ATGACCCCCAGGAGGCCGGCCCCACAGGAAGC TACCA GCCCCCTACGCCCCCCCCCAGGGACTTCGCC ACAGGAGCAGGGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCCGAC GCCCGCCTACCAGCAGGCCAGAACAGCTGTATA ACGAGCTGAACCTGGCAGGAGGGAGGAGTACGAC GTGCTGGACAAGAGGAGGGCAGGGACCCCGAGAT GGCGCGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCCAGGAGG GCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGCC AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCAGAGGA GGAGGGCAAGGGCACGACGGCCTGTACCAAGGGC TGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCC ACATGCAGGCCCTGCC CAGG	
抗 P329G-ds VL	参见表 3	21
CL	CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCGCC ATCTGTGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCCTGTT GTGTGCCCTGCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCC CACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGTAG	45
抗 P329G-ds VH	参见表 3	20
CH1	GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCCAGGCC TGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC	46

	GACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTCACACCTCCCCGCCGTGCTCAGAGTTCTGGC CTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTCTA GCAGCCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG GTGGAGCCAAGAGCTGC	
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	参见表 3	27
抗 P329G-ds-Fab- 重 链 - CD28ATD-CD28CSD- CD3ZSSD- eGFP 融 合 物 pETR17100	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAAC AGCTACGGGTGTGCATTCCCAGGCCGTGGTAGACCCA GGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACCGT GACCCTGACCTGAGGAGCAGCACCGCGCCGTGAC CACCAAGCAACTACGCCAATGGGTGCAGGAGAACCC CGACCACCTGTTACCGGCCTGATGGCGCCACCAA CAAGAGGGCCCCCGCGTCCCCGCCAGGTTAGCGG CAGCCTGATGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATCAC CGGGCCCGACCCAGGAGGACGAGGCCATCTACTTCTG CGCCCTGTTGACAGCAACCAACTGGGTGTTGGCTGT GGCACCAAGCTGACCGTGTGCGTACGGTGGCTGCA CCATCTGTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTCGCTGCTGAAT AACTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG GTGGATAACGCCCTCCAATGGGTAACCTCCAGGAGA GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCA ACAGGGGAGAGTGTAGGAATTCCCCGAAGTAACCT AGAAGCTGAAATCAACGATCAATAGCAGGTGTGGCA CACCAAGTCATACCTTGATCAAGCAACTCTGTTCCCC GGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCCGGCTGAAGG AGAAAACGTTGTTACCCGACCAACTACTCGAGAA GCTTAGTACCACTGAACGAGGCAGGGTGTGCT CAGCACAACCCAGTGTAGATCAGGCTGATGAGTCA CTGCAACCCCATGGCGACCATGGCAGTGGCTGCGT TGGCGGCCTGCCATGGAGAAATCCATGGGACGCTCT AATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTATGAGCTAACT GGTAGTCCTCCGGCCCTGATTGCGGTAATCTAAC TGCAGGACATGCTCACAAACCAGTGGGTGGTGTG TCGTAACGGCAACTCTGCAAGCGAACCGACTACTTT GGGTGTCCGTGTTCTTTATTCTATATTGGCTGCTT ATGGTGACAATAAAAAGTGTGTTACCATATAGCTATG GATTGGCCATCCGGTGTGCAACAGGGCAACTGTTAC CTATTTATTGGTTTGACCATTATCACTGAAGTCTGTG ATCACTCTCAAATTCAATTGACCCCTAACACAAATCAA	47

[0766]

[0767]

	ACGCCACCATTGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTG GTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCCGAGGTGAAG CTGCTGGAGAGCGGCAGGCCCTGGTGAGCCAG GGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTC GACTTCAGCAGGTACTGGATGAAGCTGGGTGAGGCAG GCCCCCGCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGCAGATC ACCCCCGACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGC CTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGG AGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCT ACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGCCAGG GCACCCCTGGTACCGTGAGCGCCCTAGCACCAAGG GCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGA GCACCAAGCGCGGCACAGCCGCTCTGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTCCCCGAGCCGTGACCGTGTCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTT CCCCGCCGTGTCAGAGTCTGGCCTGTATAGCTG AGCAGCGTGGTACCGTGCCTCTAGCAGCCTGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCAA GAGCTCGGAGGGGGCGGATCCTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGGCGGCGTGTGGCCTGCTACAGCCTGCT GGTACCGTGGCCTCATCATCTCTGGGTGAGGAGC AAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCAGTACATGAAC ATGACCCCCAGGAGGCCGGCCCCACCAGGAAGCAC TACCAGCCCTACGCCCCCCCCCAGGGACTTCGCCCT ACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAAGCAGGAGCGCCGAC GCCCGCCTACCAAGCAGGGCAGAACAGCTGTATA ACGAGCTGAACCTGGCAGGAGGGAGGAGTACGAC GTGCTGGACAAGAGGAGGGCAGGGACCCCGAGAT GGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCCAGGAGG GCCTGTATAACGAGCTGAGAAGGACAAGATGCCG AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGA GGAGGGCAAGGGCACGACGGCCTGTACCAAGGGCC TGAGCACGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTCCGGAGAGGGCA GAGGAAGTCTTAACATGCCGTGACGTGGAGGAGCTGT TCACCGGGGTGGTGCCTACCTGGTGAGCTGGACG GCGACGTAAACGCCACAAGTTCAAGCAGCGTGTCCGGCG AGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCC TGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCC CTGGCCCACCCCTCGTACCGACCCCTGACCTACGCC CAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACTGAAGCAG CACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACG	
--	---	--

[0768]

	TCCAGGAGCGCACCATCTTCAAGGACGACGGCA ACTACAAGACCCGCAGGTGAAGTCGAGGGCG ACACCCCTGGTAACCGCATTGAGCTGAAGGGCATCG ACTTCAAGGAGGACGGAACATCCTGGGCACAAGC TGGAGTACAACATAACAGGCCACAACGTCTATATCAT GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTAACTT CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCA GCTCGCCGACCACCTACAGCAGAACACCCCCATCGG CGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAACTACCT GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCAACGA GAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA AGTGA	
--	--	--

[0769] 表8:抗P329G-Fab氨基酸序列:

构建体	氨基酸序列	SEQ ID NO
抗 P329G CDR H1 Kabat	参见表 2	1
抗 P329G CDR H2 Kabat	参见表 2	2
抗 P329G CDR H3 Kabat	参见表 2	3
抗 P329G CDR L1 Kabat	参见表 2	4
抗 P329G CDR L2 Kabat	参见表 2	5
抗 P329G CDR L3 Kabat	参见表 2	6
抗 P329G-Fab- 重 链 - CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD 融 合 物 pETR17594	EVKLLESGGLVQPGGSLKLSKAASGFDFSRWWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLDKFIIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVAASAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVEPKSCGGGSFW VLVVVGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	48
抗 P329G-Fab 重链	EVKLLESGGLVQPGGSLKLSKAASGFDFSRWWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLDKFIIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGTL VTVAASAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVEPKSC	49

[0771]

抗 P329G-Fab 轻链	QAVVTQESALTSPGETVLTCSRSTGAVTTSNYANWV QEKPFDHLFTGLIGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQTEDEAIYFCALWYSNHWFGGGTKLTVLRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	50
抗 P329G VL	参见表 4	33
CL	参见表 6	42
抗 P329G VH	参见表 4	32
CH1	参见表 6	43
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	参见表 2	14

[0772]

表9:抗P329G-Fab DNA序列:

构建体	DNA 序列	SEQ ID NO
抗 P329G-Fab- 重 链 - CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD 融 合 物 pETR17594	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAAC AGCTACGGGTGTGCATTCCCAGGCCGTGGTAGACCCA GGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACCGT GACCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGCGCCGTGAC CACCACTACGCCAACACTGGGTGCAGGAGAACCC CGACCACTGTTACCCGGCTGATCGCGGCCACCAA CAAGAGGGCCCCCGCGTGCCGCCAGGTTAGCGGG CAGCCTGATCGCGACAAGGCCCTGACCATCAC CGGCGCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTCTG CGCCCTGTGGTACAGCAACCAACTGGGTGTTGGCG TGGCACCAAGCTGACCGTGTGCGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCGCTGAA TAACCTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATGGTAACCTCCAGGAG AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTACAAAGAGCTTC AACAGGGAGAGTGTAGGAATTCCCCGAAGTAAC TAGAAGCTGAAATCAACGATCAATAGCAGGTGTGGC ACACCAAGTCATAACCTTGATCAAGCACCTCTGTTCCC CGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGCTGAAG GAGAAAACGTTGTTACCCGACCAACTACTTCGAGA AGCTTAGTACCAACCATGAACGAGGCAGGGTGTTCGC TCAGCACAAACCCAGTGTAGATCAGGCTGATGAGTCA CTGCAACCCCATGGCGACCATGGCAGTGGCTGCGT TGGCGGCCTGCCATGGAGAAATCCATGGGACGCTCT AATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTATGAGCTAACT GGTAGTCCTCCGGCCCTGATTGCGGCTAATCCTAAC	51

[0773]

[0774]	TGCGGAGCACATGCTCACAAACCAGTGGGTGGTGTG TCGTAACGGCAACTCTGCAGCGAACCGACTACTTT GGGTGTCCGTGTTCCCTTATTCCCTATATTGGCTGCTT ATGGTGACAATAAAAAGTTGTTACCATATAGCTATTG GATTGCCATCCGGTGTGCAACAGGGCAACTGTTAC CTATTTATTGGTTTGTAACCATATCACTGAAGTCTGTG ATCACTCTCAAATTCAATTGACCCCTAACACAAATCAA ACGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTG GTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCCGAGGTGAAG CTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCGCTGGTGCAGCCCGC GGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTC GACTTCAGCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAG GCCCCCCGGCAAGGGTCTGGAGTGGATGGCGAGATC ACCCCCGACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGC CTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGG AGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCT ACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGCCAGG GCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACCAAGG GCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGA GCACCAGCGCGGCACAGCCGCTGGGCTGCGTGG TCAAGGACTACTCCCCGAGCCCCTGACCGTGTCC GAACAGCGGAGGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTT CCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTCTAGCAGCCTGG ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCAA GAGCTCGGAGGGGGCGGATCCTCTGGGTGCTGG GGTGGTGGGCGGCGTGTGGCCTGCTACAGCCTGCT GGTGACCGTGGCCTCATCATCTGGGTGAGGAGC AAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC ATGACCCCCAGGAGGCCGGCCCCACCAAGGAAGC TACCAAGCCCTACGCCCCCCCCCAGGGACTTCGCC ACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCC GCCCGCCTACCAAGCAGGGCCAGAACCAAG ACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTACGAC GTGCTGGACAAGAGGAGGGCAGGGACCCCGAGAT GGCGCGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGGAGG GCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGCC AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGA GGAGGGCAAGGCCACGACGGCCTGTACCAAGGCC TGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCC ACATGCAGGCCCTGCCCCCAGG	
抗 P329G VL	参见表 5	37
CL	参见表 7	45

抗 P329G VH	参见表 5	36
CH1	参见表 7	46
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	参见表 3	27
抗 P329G-Fab- 重 链 - CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD- eGFP 融合物 pETR17594	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAAC AGCTACGGGTGTGCATTCCCAGGCCGTGGTAGCCCA GGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACCGT GACCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCGCGCCGTGAC CACCAAGCAACTACGCCAATGGGTGCAGGAGAACCC CGACCACCTGTTCACCGGCCTGATGGCGGACCAA CAAGAGGGCCCCCGCGTGCCGCCAGGTTAGCGG CAGCCTGATGGCGACAAGGCCCTGACCATCAC CGGCGCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTCTG CGCCCTGTTGAGCAACCAACTGGGTGTTGGCG TGGCACCAAGCTGACCGTGTGCGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTCGCTGAA TAACCTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATGGGTAACTCCCAGGAG AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTC AACAGGGAGAGTGTAGGAATTCCCCGAAGTAAC TAGAACAGTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGTGTGG ACACCAAGTCATACTTGTGATCAAGCAGTCTGTTCCC CGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGCTGAAG GAGAAAACGTTGTTACCCGACCAACTACTTCGAGA AGCTTAGTACCAACCATGAACGAGGCAGGGTGTTCGC TCAGCACAAACCCAGTGTAGATCAGGCTGATGAGTCA CTGCAACCCCCATGGCGACCATGGCAGTGGCTGCGT TGGCGGCCTGCCATGGAGAAATCCATGGGACGCTCT AAATTCTGACATGGGTGAAGTGCCTATTGAGCTAACT GGTAGTCCTCCGGCCCTGATTGCGGTAATCCTAAC TGCAGGACACATGTCACAAACCAAGTGGGTGGTGTG TCGTAACGGCAACTCTGCAGCGAACCGACTACTTT GGGTGTCCGTGTTCTTTATTCTATATTGGCTGCTT ATGGTGACAATAAAAAGTGTGTTACCATATAGCTATTG GATTGGCCATCCGGTGTGCAACAGGGCAACTGTTAC CTATTTATTGGTTTGTAACCAATTACTGAAGTCTGTG ATCACTCTCAAATTCAATTGACCCCTAACACAA ACGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGTG GTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCCGAGGTGAAG CTGCTGGAGAGCGGCGGGCGCTGGTAGCCAGCGGCTTC GGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTC	52

[0775]

[0776]

	GACTTCAGCAGGTACTGGATGAACCTGGGTGAGGCAG GCCCCCGCAAGGGTCTGGAGTGGATCGCGAGATC ACCCCCGACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGC CTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGG AGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCT ACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGCCAGG GCACCCCTGGTACCGTGAGCGCCGCTAGCACCAAGG GCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGA GCACCAGCGCGGCACAGCCGCTCTGGCTGCCCTGG TCAAGGACTACTCCCCGAGCCCCTGACCGTGTCCCTG GAACAGCGGAGGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTT CCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCCTCTAGCAGCCTGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCAA GAGCTCGGGAGGGGGCGGATCCTCTGGGTGCTGGT GGTGGTGGCGGGCGTGTGGCCTGCTACAGCCTGCT GGTGACCGTGGCCTCATCATCTCTGGGTGAGGAGC AAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC ATGACCCCCAGGAGGCCGGCCCCACCAGGAAGCAC TACCAGCCCTACGCCCTCCAGGGACTCGCCGCCT ACAGGAGCAGGGTAAGTTCACTCAGCAGGAGCGCCGAC GCCCGCCTACCAAGCAGGCCAGAACAGCTGTATA ACGAGCTGAACCTGGCAGGAGGGAGGAGTACGAC GTGCTGGACAAGAGGAGGGCGAGGACCCCGAGAT GGCGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCCAGGAGG GCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGCCG AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGA GGAGGGCAAGGCCACGACGCCCTGTACCAAGGGCC TGAGCACGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCCTAGGTGAGCAAGGGCGAGGAGTGT GAGGAAGTCTCTAACATGCCGTGACGTGGAGGAGA ATCCCGCCCTAGGGTGGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT TCACCGGGGTGGTGCCTACCTGGTCAGCTGGACG GCGACGTAACGCCACAAGTTCACTCAGCGTGTCCCG AGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGCCAAGCTGACCC TGAAGTTCACTGCACCAAGGGCAAGCTGCCGTGCC CTGGCCCACCCCTCGTGAACCAAGGTGACCTACGCC CAGTGCCTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAG CACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACG TCCAGGAGCGCACCACCTCTCAAGGACGACGGCA ACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTGAGGGCG ACACCCGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCACAAGC	
--	--	--

[0777]

	TGGAGTACAACATAAACAGGCCAACAGTCTATATCAT GGCGACAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCT CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCA GCTCGCCGACCCTACCCAGCAGAACACCCCCATCGG CGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAACTACCT GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGA GAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA AGTGA	
--	---	--

[0778] 表10:抗AAA-scFv氨基酸序列

构建体	氨基酸序列	SEQ ID NO
抗 AAA CDR H1 Kabat	SYGMS	53
抗 AAA CDR H2 Kabat	SSGGSY	54
抗 AAA CDR H3 Kabat	LGMITTGYAMDY	55
抗 AAA CDR L1 Kabat	RSSQTIVHSTGHTYLE	56
抗 AAA CDR L2 Kabat	KVSNRFS	57
抗 AAA CDR L3 Kabat	FQGSHVPYT	58
抗 AAA-scFv-CD28ATD- CD28CSD- CD3zSSD 融合物	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDGSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSDVLMTQTPLSPVSLGDQASISCRSSQTIV HSTGHTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFFGG TKLEIKGGGSFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFIWV RSKRSRLLHSDDYMNMPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDV LDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	59
抗 AAA-scFv	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDGSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSDVLMTQTPLSPVSLGDQASISCRSSQTIV HSTGHTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFFGG TKLEIK	60

[0780]

抗 AAA VH	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYGMWSVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDHSVKGRTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYCYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSVTVSS	61
抗 AAA VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHSTGHTYLE WFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFRGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK	62

[0781]

表11:抗AAA-Fab氨基酸序列

构建体	蛋白序列	SEQ ID NO
抗 AAA CDR H1 Kabat	参见表 10	53
抗 AAA CDR H2 Kabat	参见表 10	54
抗 AAA CDR H3 Kabat	参见表 10	55
抗 AAA CDR L1 Kabat	参见表 10	56
抗 AAA CDR L2 Kabat	参见表 10	57
抗 AAA CDR L3 Kabat	参见表 10	58
抗 AAA-Fab- 重 链 - CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD 融合物	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYGMWSVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDHSVKGRTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYCYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCGGGSFWVLVVGGVLACYSLVT VAFIIFWVRSKRSRLLHSYDMNMTPRPGPTRKHYQPY APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLG RREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	63
抗 AAA-Fab 重链	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYGMWSVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDHSVKGRTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYCYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC	64
抗 AAA-Fab 轻链	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHSTGHTYLE WFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFRGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWK	65

[0783]

	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
抗 AAA VL	参见表 10	62
CL	参见表 6	42
抗 AAA VH	参见表 10	61
CH1	参见表 6	43

[0784]

表12

构建体	氨基酸序列	SEQIDNO
人 CD27	ATGGCGCGCCGCATCCGTGGTGGCTGTGCGTGCTGG GCACCCCTGGTGGCCTGAGCGCGACCCCGGCCGA AAAGCTGCCCGGAACGCCATTATTGGCGCAGGGCA AACTGTGCTGCCAGATGTGCGAACCGGGCACCTTCT GGTAAAGATTGCGATCAGCATCGCAAAGCGGGCA GTGCGATCCGTGCATTCCGGCGTGAGCTTAGCCG GATCATCATACCCGCCGCATTGCGAAAGCTGCCGCC ATTGCAACAGCGGCCTGCTGGTGCAGCAACTGCACCAT TACCGCGAACCGGAATGCGCGTGCAGCAACGGCTG GCAGTGCAGCGATAAAGAAATGCAACCGAACGCGATCCG CTGCCGAACCCGAGCCTGACCGCGCAGCAGCCAG GCGCTGAGCCCGCATCCGAGCCGACCCATCTGCCGT ATGTGAGCGAAATGCTGGAAGCGCGACCGCGGGCC ATATGCAGACCCCTGGCGAATTTCGCCAGCTGCCGCC GCGCACCCCTGAGCACCCATTGGCGCCGAGCGCAG CCTGTGCAGCAGCGATTATTGCAATTCTGGTATT TTAGCGGCATTTCTGGTATTACCTGGCGGGCGC GCTGTTCTGCATCAGCGCCGAAATATCGCAGAAC AAAGCGAAAGCCCGTGGAACCGGGCGAACCGTG CCATTATAGCTGCCCGCGGAAGAAGAAGGCAGCAC CATTCGATTAGGAAGATTATCGCAAACCGAACCG GCGTGCAGCCCG	66
人 CD27	MARPHPWWLVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGK LCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVFSFDPH HTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQC RDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEM LEARTAGHMQLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFI RILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPA EPCHYSCPREEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	67
鼠 CD27	ATGGCGTGGCCGCCGTATTGGCTGTGCATGCTGG GCACCCCTGGTGGCCTGAGCGCGACCCCTGGCGCCGA ACAGCTGCCCGATAAACATTATTGGACCGGGCACCTTT CCTGTGCTGCCGCATGTGCGAACCGGGCACCTTT GTGAAAGATTGCGAACAGGATCGCACCGCGCGCAG TGCGATCCGTGCATTCCGGGCACCAGCTTAGCCGG ATTATCATACCCGCCGCATTGCGAAAGCTGCCGCAT	68

	TGCAACAGCGGCTTCTGATTGCAACTGCACCGTGA CCGCGAACCGCGAATGCAGCTGCAGCAAAACTGGC AGTGCCCGATCAGGAATGCACCGAATGCGATCCGCC GCTGAACCGCGCTGACCCGCCAGCCAGCGAAAC CCCGAGCCCGAGCCGCCGACCCATCTGCCGCAT GGCACCGAAAAACCGAGCTGGCCGCTGCATGCCAG CTGCCGAACAGCACCGTGTATAGCCAGCGCAGCAGC CATGCCCGCTGTCAGCAGCATTGCAATTGCAATT TGTGACCTTAGCAGCATGTTCTGATTTTGCTGG GCGCGATTCTGTTTTCATCAGGCCGCAACCATGG CCCGAACGAAGATGCCAGCGGTGCCGGAAGAAC GTGCCCGTATAGCTGCCGCCGAAGAAGAAGGCAG CGCGATTCCGATTAGGAAGATTATCCCAAACCGGAA CCGGCGTTTATCCG	
[0786]	鼠 CD27 MAWPPPYWLMLGLVLSATLAPNSCPDKHYWTGG GLCRMCEPGTFFVKDCEQDRTAACQCDPCIPGTSFSPD YHTRPHCESCRHCNSGFLIRNCTVTANAECSCSKNWQC RDQECECDPPLNPALTRQPSETPSPQPPPTHLPHGTEKP SWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRIFVTFSSMFL IFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQAVPEEPCPYSCPREEE GSAIPIQEDYRKPEPAFYP	69
	人 CD28 ATGCTGCGCCTGCTGGCGCTGAACCTGTTCCGA GCATTCAAGGTGACCGGCAACAAAATTCTGGTAAAC AGAGCCCGATGCTGGTGGCGTATGATAACCGGTGAA CCTGAGCTGCAAATATAGCTATAACCTGTTAGCCCG AAATTGCGCGAGCCTGCATAAAGGCCTGGATAGCGC GGTGGAAAGTGTGCGTGGTGTATGGCAACTATAGCCAG CAGCTGCAGGTGTATAGCAAAACCGGCTTAACCG ATGGCAAACGGCAACGAAAGCGTGACCTTTATCT GCAGAACCTGTATGTGAACCAGACCGATATTATTTT GCAAAATTGAAGTGATGTATCCGCCGCCGTATCTGGAT AACGAAAAAAAGCAACGGCACCATTATTATGTGAAA GGCAAACATCTGCCCCGAGCCGCTGTTCCGGGCC CGAGCAAACCGTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGCG GCGTGCCTGGCGTGTATAGCCTGCTGGTGACCGTGGC GTTTATTATTGGTGCGCAGCAAACGCAGCCGC CTGCTGCATAGCGATTATATGAACATGACCCGCC CCCGGGCCCGACCGCAAACATTATCAGCCGTATGCG CCGCCCGCGATTGGCGTATCGCAGC	70
	人 CD28 MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDN AVNLSCKSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVGNYSQL QVYSKTGFNCDGKLGNESVTFLQNLYVNQTDIYFCKI EVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY MNMTPRRGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	71

[0787]

[0787]	鼠 CD28	ATGACCCCTGCGCCTGCTGTTCTGGCGCTGAACCTTT TTAGCGTCAGGTGACCGAAAACAAAATTCTGGTGA AACAGAGCCCGCTGCTGGTGGTGGATAGCAACGAAG TGAGCCTGAGCTGCCGTATAGCTATAACCTGCTGGC GAAAGAATTTCGCGAGCCTGTATAAAGGCCTGAA CAGCGATGTGGAAGTGTGCGTGGGCAACGGCAACTT TACCTATCAGCCGCAGTTCGCAGCAACCGGAAATT AACTGCGATGGCGATTTGATAACGAAACCGTGACCT TTCGCCTGTGGAACCTGCATGTGAACCATAACCGATATT TATTTTGCAAAATTGAATTATGTATCCGCCCGTAT CTGGATAACGAACGCAGCAACGGCACCATATTCTATA TTAAAGAAAAACATCTGTGCCATACCCAGAGCAGCCC GAAACTGTTTGGCGCTGGTGGTGGCGGGCGT GCTGTTTGCTATGGCCTGCTGGTGACCGTGGCGCTG TGCGTGAATTGGACCAACAGCCGCCAACCGCCTG CTGCAGAGCGATTATATGAACATGACCCCGCGCC CGGGCCTGACCCGCAAACCGTATCAGCCGTATGCGCC GGCGCGCGATTTGCGCGTATGCCCG	72
	鼠 CD28	MTLRLFLALNFFSVQVTENKILVKQSPLVVDSNEVSL SCRYSYNLLAKEFRASLYKGVNNDVEVCVGNGNFTYQ PQFRSNAEFNCDGDFDNETVTFLWNLHVNHDIYFCK IEFMYPYYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWAL VVVAGVLFCYGLLVTVALCVIWTNSRRNRLQSDYMN MTPRRPGLTRKPYQPYAPARDFAAYRP	73
	人 CD137	ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCACTCTGT TGCTGGCCTCAACTTGTGAGAGGACAAGATCATTGCA GGATCCTTGTAGTAACCTGCCAGCTGGTACATTCTGT GATAATAACAGGAATCAGATTGCACTGCCCTGTCCTC CAAATAGTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCT GTGACATATGCAGGCAGTGAAAGGTGTTTCAGGAC CAGGAAGGAGTGTCCCTCACCAGCAATGCAGAGTG TGAATGCACCTCAGGGTTCACTGCCTGGGGCAGG ATGCAGCATGTGAAACAGGATTGAAACAAGGTCA AGAACTGACAAAAAAAGGTGAAAGACTGTTGCTT TGGGACATTAAACGATCAGAAACGTGGCATCTGTCGA CCCTGGACAAACTGTTCTTGGATGGAAAGTCTGTG TTGTGAATGGGACGAAGGGAGGGACGTGGTCTGTG GACCATCTCCAGCCGACCTCTCCGGAGCATCCTC TGTGACCCCGCCTGCCCCCTGCGAGAGAGGCCAGGACA CTCTCCGAGATCATCTCCTCTTCTGCGCTGACGT CGACTCGTTGCTCTCCTGCTGTTCTCCTCACGCTC CGTTCTGTTAAACGGGGCAGAAAGAAACTCC TGTATATATTCAAACACCATTATGAGACCAGTACAA ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACGTGTA	74

	人 CD137	MGNSCYNIVATLLVLFNFRTRSLQDPCSNCPAGTFCDN NRNQICSPCPPNSFSSAGGQRCDICRQCKGVFRTRKEC SSTSNAECDCPTGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKK GCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSDLGKSVLVNGTK ERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFL ALTSTALLFLFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	75
[0788]	鼠 CD137	ATGGGCAACAACGTCTATAACGTGGTGGTGATTGTGC TGCTGCTGGTGGGCTGCGAAAAAGTGGCGCGGTGC AGAACAGCTGCGATAACTGCCAGCCGGCACCTTT GCCGCAAATATAACCCGGTGTGCAAAAGCTGCCGCC GAGCACCTTAGCAGCATTGGCGGCCAGCGAACTG CAACATTGCCGCGTGTGCGCGGGCTATTCGCTTTA AAAAATTTCGACGAGCACCCATAACCGCGGAATGCG AATGCATTGAAGGCTTCATTGCGCTGGGCCGCAGTG CACCCGCTGCGAAAAGATTGCCGCCGGGCCAGGA ACTGACCAAACAGGGCTGCAAAACCTGCAGCCTGGG CACCTTAACGATCAGAACGGCACCGCGTGTGCCG CCCGTGGACCAACTGCAGCCTGGATGGCCGCAGCGT GCTGAAAACCGGCACCACCGAAAAGATGTGGTGTG CGGCCCCCGGTGGTGAGCTTAGCCCGAGCACAC CATTAGCGTACCCCCGGAAGGCGGCCGGCGGCCA TAGCCTGCAGGTGCTGACCCCTGTTCTGGCGCTGACC AGCGCGCTGCTGGCGCTGATTTTATTACCTGCT GTTTAGCGTGTGAAATGGATTGCAAAAAATTCCG CATATTTTAAACAGCCGTTAAAAAAACCACCGCG CGCGCAGGAAGAAGATGCGTGCAGCTGCCGCTGCC CGCAGGAAGAAGAAGGCGCGGCCGGCTATGAA CTG	76
	鼠 CD137	MGNNCYVVIVLLVGCEKVGVAVQNCDNCQPGTFC RKYNPVCKSCPSTFSSIGGQPNCNICRCAGYFRKKF CSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQ GCKTCSLGTFNDQNGTGVCRPWTNCSDLGRSVLKTGT TEKDVGCGPPVVSFPSTTISVTPEGPGGHSLQVLTFL ALTSALLLALIFITLLFSVLKWIRKKFPHIFKQPFKTTG AAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYEL	77
	人 OX40	ATGTGCGTGGCGCGCCCTGGGCCGCGGCCG TGCAGCGCGCTGCTGCTGCTGGGCTGGGCTGAGC ACCGTGACCGGCCTGCATTGCGTGGCGATAACCTATC CGAGCAACGATCGCTGCTGCCATGAATGCCGCCGG CAACGGCATGGTGAGCCGCTGCAGCCGAGCCAGAA CACCGTGTGCCGCCGTGCGGCCGGCTTTATAAC GATGTGGTGAGCAGCAAACCGTGCACCGTGCACC TGGTGCAACCTGCGCAGCGCAGCGAACGCAAACAG CTGTGACCGCGACCCAGGATAACCGTGTGCCGCTGCC	78

	GCGCGGGCACCCAGCCGCTGGATAGCTATAAACCGG GCGTGGATTGCAGCGCCGTGCCGCCGGGCATTAG CCCGGGCGATAACCAGGCCTGCAAACCGTGGACCAA CTGCACCCCTGGCGGGCAAACATACCCCTGCAGCCGGC GAGCAACAGCAGCGATGCGATTGCGAAGATCGCGA TCCGCCGGCGACCCAGCCGCAGGAAACCCAGGGCCC GCCGGCGCGCCGATTACCGTGCAGCCGACCGAAC GTGGCCCGCGCACCAGCCAGGGCCCGAGCACCCGCC GGTGGAAAGTGCCGGCGGCCGCGTGGCGCGAT TCTGGGCCTGGGCCTGGTGCCTGGGCCTGCTGGGCC GCTGGCGATTCTGCTGGCGCTGTATCTGCTGCCGC GATCAGCGCCTGCCGCCGGATGCGCATAAACCGCCGG GCGGCGGCAGCTTCGCACCCGATTAGGAAGAAC AGGCAGATGCGCATAGCACCCCTGGCGAAAATT		
[0789]	人 OX40	MCVGARRLGRGPCAALLLGLLSTVTLHCVGDTYP SNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCPGFYND VVSSKPKPCTWCNLRSGERKQLCTATQDTVCRCRA GTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCT LAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPI VQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVGL LGPLAILLALYLLRRDQRLLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEE QADAHSTLAKI	79
	鼠 OX40	ATGTATGTGTGGGTGCAGCAGCCGACCGCGCTGCTGC TGCTGGCGCTGACCCCTGGCGTGACCGCGCGCC TGAACACTGCGTAAACATACCTATCCGAGCGGCCATAA ATGCTGCCGCGAATGCCAGCCGGCCATGGCATGGTG AGCCGCTGCGATCATACCCCGGATACCCCTGTGCCATC CGTGCAGAACCGGCTTTATAACGAAGCGGTGAACTA TGATACCTGCAAACAGTCACCCAGTGCACCATCGC AGCGGCAGCGAACTGAAACAGAACTGCAACCCGACC CAGGATACCGTGTGCCGTGCCGCCGGCACCCAG CCGGCCAGGATAGCGGCTATAAACTGGCGTGGATT GCGTGCCGTGCCGCCGGGCAITTAGCCGGCAA CAACCAGCGTGCACCCGGGACCAACTGCACCCCT GAGCGCAAACAGACCCGCATCCGGCGAGCGATAG CCTGGATCGGGTGTGCGAAGATCGCAGCCTGCTGGC GACCCCTGCTGTGGAAACCCAGCGCCGACCTTTCG CCCGACCAACCGTGCAGAGCACCACCGTGTGGCGCG CACCAAGCGAACTGCCAGGCCGCCGACCCCTGGTGAC CCCGGAAGGCCGGCGTTGCCGTGCTGGGCCT GGGCCTGGGCCTGCTGGCGCCGCTGACCGTGTGCT GGCGCTGTATCTGCTGCGCAAAGCGTGGCGCTGCCG AACACCCGAAACCGTGCCTGGGGCAACAGCTTCGC ACCCCGATTAGGAAGAACATACCGATGCGCATTAA CCCTGGCGAAAATT	80

[0790]

[0790]	鼠 OX40	MYVVVQQPTALLLALTLGVTARRLNCVKHTYPSGHK CCRECQPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCETGFYNEAVNY DTCKQCTQCNCNRSGSELKQNCTPTQDTVCRCRPGTQP RQDSGYKLGVDVCP CPPGHFSPGNQACKPWTNCTL GKQTRHPASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTV QSTTVWPRTSELPSPPTLVTPPEGPAFAVLLGLGLLAPL TVLLALYLLRKAWRLPNTPKPCWGNSRTPIQEEHTDA HFTLAKI	81
	人 ICOS	ATGAAAAGCGGCCTGTGGTATTTCCTGTTTGCT GCGCATTAAAGTGTGACCGCGAAATTAACGGCAG CGCGAACTATGAAATGTTATTTCATAACGGCG TGCAGATTCTGTGCAAATATCCGGATATTGTGCAGCAG TTTAAATGCAGCTGCTGAAAGGCAGGCCAGATTCTGT GCGATCTGACCAAAACCAAAAGGCAGCGGAAACACCG TGAGCATTAAGCCTGAAATTGCCCCATAGCCAGCT GAGCAACAACAGCGTGAGCTTTCTGTATAACCTG GATCATAGCCATGCGAACTATTATTTGCAACCTGAG CATTTTGATCCGCCGCGTTAAAGTGACCTGACC GGCGCTATCTGCATAATTATGAAAGCCAGCTGTGCTG CCAGCTGAAATTGGCTGCCGATTGGCTGCGCGCG TTTGTGGTGGTGTGCATTCTGGCTGCATTCTGATTG CTGGCTGACCAAAAAAAATATAGCAGCAGCGTGCAT GATCCGAACGGCGAATATATGTTATGCGCGCGGTGA ACACCGCGAAAAAAAGCCGCTGACCGATGTGACCC TG	82
	人 ICOS	MKSGLWYFFLFCLRIKVLTGEINGSANYEMIFHNGGV QILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKGSNTVSI KSLKFCHSQLSNNVSFFLYNLDHSHANYYFCNLSIFDP PPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVCI LGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRNAVNTAKSR LTDVTL	83
	鼠 ICOS	ATGAAACCGTATTTCGCCGCGTGTGTTGCTT TCTGATTGCGCTGCTGACCGCGAAATTAACGGCAGC GCGGATCATCGCATGTTAGCTTCTATAACGGCGCGT GCAGATTAGCTGCAAATATCCGAAACCGTGCAGCAG CTGAAAATGCGCTGTTCGCGAACCGCAAGTGTGCT GCGAACTGACCAAAACCAAAAGGCAGCGGAAACCG GTGAGCATTAAAACCCGATGCTGTGCCTGTATCATCT GAGCAACAACAGCGTGAGCTTTCTGAACAACCC GGATAGCAGCCAGGGCAGCTATTATTTGAGCAGCTG AGCATTGATCCGCCGCCGTTCAAGAACGCAACC TGAGCGCGGCTATCTGCATAATTATGAAAGCCAGCT GTGCTGCCAGCTGAAACTGTGGCTGCCGGTGGCTG CGCGCGTTGTGGTGGTGTGCTGCTGTTGGCTGCATT CTGATTATTGGTTAGCAAAAAAAATATGGCAGCA	84

	GCGTGCATGATCCGAACAGCGAACATATATGTTATGGCG GCGGTAAACACCAACAAAAAAGCCGCCTGGCAGG CGTGACCAGC	
鼠 ICOS	MKPYFCRVFVFCFLIRLLTGEINGSADHRMFSFHNGGV QISCKYPETVQQLKMRLFREREVLCELTKTKGSGNAVSI KNPMLCLYHLSNNNSVSFFLNPDSSQGSYYFCSLSIFDP PPFQERNLSSGGYLHIYESQLCQLKLWLPVGCAAFVVV LLFGCILIIWFSKKYGSSVHDPNSEYMFMAAVNTNKK SRLAGVTS	85
人 DAP10	ATGATTCATCTGGGCCATATTCTGTTCTGCTGCTGCT GCCGGTGGCGGGCGCAGACCACCCGGCGAACG CAGCAGCCTGCCCGCTTTATCCGGCACCGAGCGC AGCTGCAGCGGCTGCCGCAGCCTGAGCCTGCCGCTG CTGGCGGGCCTGGTGGCGGGATGCCGTGGCGAGC CTGCTGATTGTGGCGCGGTGTTCTGTGCGCGGCC CGCGCCGCAGCCGGCGCAGGAAGATGGCAAAGTGT ATATTAACATGCCGGGCCGCGC	86
人 DAP10	MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCS GCGSLSLPLLALGLVAADAVASLLIVGAFLCARPRRSPA QEDGKVYINMPGRG	87
鼠 DAP10 [0791]	ATGGATCCGCCGGCTATCTGCTGTTCTGCTGCTGCT GCCGGTGGCGGGAGCCAGACCAGCGCGGAGCTG CAGCGCCTGCCGCACCCCTGAGCCTGCCGCTGCTG GGGCCTGGTGGCGGGATGCCGTGATGAGCCTGCT GATTGTGGCGTGGTGTGTTGTGATGCCGTGATG GGCCGCCCGCGCAGGAAGATGCCCGTGTATATTA ACATGCCGGGCCGCGC	88
鼠 DAP10	MDPPGYLLFLLLLPVAASQTSAGSCSGCGTLSPLLAGL VAADAVMSLLIVGVVFVCMRPHGRPAQEDGRVYINMP GRG	89
人 DAP12	ATGGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGCTCCTGCTC CTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGCTCCGTCCTG TCCAGGCCAGGCCAGAGCGATTGCAAGTGTCTAC GGTAGGCCGGCGTGTGGCAGGGATGTGATGGG AGACCTGGTGTGACAGTGCTCATGCCCTGGCGTG TACTCTGGCCGGCTGGCCCTCGGGCGAGGG GCTGCCGAGGCAGCGACCCGGAAACAGCGTATCACT GAGACCGAGTCGCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAG AGGTGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGG CCGTATTACAAATGA	90
人 DAP12	MGGLEPCSRLLLLPLLAVSLRPVQAQAQSDCSCSTV SPGVLAGIVMDLVLTVLIALAVYFLGLVPRGRGAAE AATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	91
鼠 DAP12	ATGGGGCTCTGGAGCCCTCTGGTGCCTCTGTTCC TTCCTGCTCCTGACTGTGGGAGGATTAAGTCCCGT	92

	ACAGGCCAGAGTGACACTTCCAAGATGCGACTG TTCTTCGTGAGCCCTGGTACTGGCTGGATTGTT CTGGGTGACTTGGTGTGACTCTGCTGATTGCCCTGG CTGTGTACTCTGGCCGCCTGGCTCCGAGGTCA AGGGACAGCGGAAGGGACCCGGAAACACAACATG CTGAGACTGAGTCGCCTTATCAGGAGCTTCAGGGTCA GAGACCAGAAGTATAACAGTGACCTAACACACAGAG GCAATTACAGATGA	
鼠 DAP12	MGALEPSWCLLFLPVLLTVGGLSPVQAQSDFPRCDCS SVSPGVLAGIVLGLDLVLLIALAVYSLGRLVSRGQGTA EGTRKQHIAETESPYQELQGQRPEVYSDLNTQRQYYR	93
人 CD3z	MWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLDPKLCYLLDGIL FIYGVILTLFLRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLG RREYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRNPQEGLYNELQ DKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	94
[0792]	ATGAAGTGGAAAGCGCTTTCACCGCGGCCATCCTGC AGGCACAGTTGCCGATTACAGAGGCACAGAGCTTG GCCTGCTGGATCCCAAACCTCTGCTACCTGCTGGATGG AATCCTCTTCATCTATGGTGTCACTCTCACTGCCCTGT TCCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCCCC CCCGTACCAAGCAGGGCCAGAACCCAGCTCTATAACG AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGG GAAAGCCGAGAAGAACCCCTAGGAAGGCCCTG TACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGAGGCC TACAGTGAGATTGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGG GGCAAGGGGCACGATGCCCTTACCAAGGGTCTCAGT ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATG CAGGCCCTGCCCTCGCTAA	95
鼠 CD3z	MWKVSVLACILHVRFPGEAQSFGLDPKLCYLLGI LFIYGVIIITALYLRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNL GRREYDVLEKKRARDPEMGGKQQRRNPQEVYNA LQDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQTLAPR	96
鼠 CD3z	ATGAAGTGGAAAGTGTCTGTTCTGCCCTGCATCCTCC ACGTGCGGTTCCCAGGAGCAGAGGCACAGAGCTTG GTCTGCTGGATCCCAAACCTGCTACTTGCTAGATGG AATCCTCTTCATCTACGGAGTCATCATCACAGCCCTGT ACCTGAGAGCAAAATTCACTGAGGAGTCAGAGACTG CTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATG AGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTT GGAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAG GCAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCCAGGAAGGC GTATACAATGCAGAAAGACAAGATGGCAGAA	97

	GCCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGC AGAGGCAAGGGCAGATGCCCTTACAGGGCTC AGCACTGCCACCAAGGACACCTATGCCCCGCATA TGCAGACCCTGGCCCTCGCTAA	
人 FCGR3A	MWQLLLPTALLLVSAGMRTEDELPKAVVLEPQWYRV LEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESSLSSQASSYFI DAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAP RWVFKEEDIPIHLRCHSWKNTALHKVTLQNGKGRKYF HHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSETVNITIT QGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVK TNIRSSTRDWKDHFKWRKDPQDK	98
人 FCGR3A	ATGTGGCAGCTGCTGCGACCGCGCTGCTGCTGC TGGTGAGCGCGGGCATGCGCACCGAACGATCTGCCGA AAGCGGTGGTTCTGGAACCGCAGTGGTATCGCGT GCTGGAAAAAGATAGCGTGACCTGAAATGCCAGGG CGCGTATAGCCCGAACGATAACAGCACCCAGTGGTT CATAACGAAAGCCTGATTAGCAGCCAGGCAGCAGC TATTTTATTGATGCGCGACCGTGGATGATAGCGCGA ATATCGCTGCCAGACCAACCTGAGCACCCCTGAGCGAT CCGGTCAGCTGGAAGTGCATATTGGCTGGCTGCTGC TGCAGGCGCCGCGCTGGGTGTTAAAGAAGAACGATC CGATTCATCTGCGCTGCCATAGCTGGAAAAACACCGC GCTGCATAAAGTGACCTATCTGAGAACGGCAAAGG CCGCAAATATTTCATCATAACAGCGATTATATTCC GAAAGCGACCTGAAAGATAGCGGCAGCTATTGTC CGCGGCCTGTTGGCAGCAAAACGTGAGCAGCGAA ACCGTGAACATTACCAATTACCCAGGGCTGGCGGTGA GCACCAATTAGCAGCTTTTCCGCCGGCTATCAGGT GAGCTTTGCCCTGGTGATGGTGTGCTGTTGCGGTG GATAACGGCCTGTATTTAGCGTGAAAACCAACATT GCAGCAGCACCCCGAATTGGAAAGATCATAAATTAA ATGGCCAAAGATCCGCAGGATAAA	99
鼠 FCGR3A	MFQNAHSGSQWLPLTILLFAFADRQSAALPKAVVK LDPPWIQVLKEDMVTLMCEGTHNPGNNSSTQWFHNGRS IRSQVQASYTFKATVNDSGEYRCQMEQTRLSDPVDLGV ISDWLLLQTPQRVFLGETITLRCHSWRNKLLNRISFFH NEKSRYHHYKSNSIPKANHSHSGDYYCKGSLGSTQH QSKPVTITVQDPATTSSISLVWYHTAFSLVMCLLFAVDT GLYFYVRRNLQTPREYWRKSLSRKHQAPQDK	100
鼠 FCGR3A	ATGTTTCAGAACATGCACACTCTGGAAGCCAATGGCTAC TTCCACCACTGACAATTCTGCTGCTGTTGCTTTGCA GACAGGCAGAGTGCAGCTCTCCGAAGGCTGTGGTG AAACTGGACCCCCCATGGATCCAGGTGCTCAAGGAA GACATGGTGACACTGATGTGCGAAGGGACCCACAAC CCTGGGAACCTTCTACCCAGTGGTCCACAACGGGA	101

[0793]

	GGTCATCCGGAGCCAGGTCCAAGCCAGTTACACGTT TAAGGCCACAGTCAATGACAGTGGAGAATATCGGTGT CAAATGGAGCAGACCCGCCTCAGCGACCCTGTAGAT CTGGGAGTGATTCTGACTGGCTGCTGCTCCAGACCC CTCAGCGGGTGTCTGGAAGGGAAACCACATCACGC TAAGGTGCCATAGCTGGAGGAACAAACTACTGAACA GGATCTCATCTTCCATAATGAAAATCCGTGAGGTAT CATCACTACAAAGTAATTCTCTATCCAAAAGCCA ACCACAGTCACAGTGGGGACTACTACTGCAAAGGAA GTCTAGGAAGTACACAGCACCAGTCCAAGCCTGTCA CCATCACTGTCCAAGATCCAGCAACTACATCCTCCAT CTCTCTAGTCTGGTACCACACTGCTTCTCCCTAGTGA TGTGCCTCCTGTTGCAGTGGACACGGGCCTTATT CTACGTACGGAGAAATCTCAAACCCGAGGGAGTA CTGGAGGAAGTCCCTGTCAATCAGAAAGCACCAGGC TCCTCAAGACAAGTGA	
[0794]	人 NKG2D MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQK QRCPVVKSKCRENASPFFFCFIAVAMGIRFIIMVAIWSA VFLNSLFNQEVTQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFD ESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVSY HWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDCA LYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV	102
	人 NKG2D ATGGGCTGGATTCGCGCCGCCGCAGCCGCCATAGCT GGGAAATGAGCGAATTCTATAACTATAACCTGGATCT AAAAAAAAGCGATTCTAGCACCCGCTGGCAGAAACA GCGCTGCCCGGTGGTAAAAGCAAATGCCGCGAAAA CGCGAGCCCGTTTTTTTGCTGCTTATTGCGGTGG CGATGGGCATTGCTTTATTATGGTGGCGATTGG AGCGCGGTGTTCTGAACAGCCTGTTAACCAGGAA GTGCAGATTCCGCTGACCGAAAGCTATTGCGGCCGT GCCCGAAAAACTGGATTGCTATAAAAACAAC TGCTA TCAGTTTTGATGAAAGCAAAACTGGTATGAAAGC CAGGCGAGCTGCATGAGCCAGAACCGCAGCCTGCTG AAAGTGATAGCAAAGAAGATCAGGATCTGCTGAAA CTGGTAAAAGCTATCATTGGATGGCTGGTGCATA TTCCGACCAACGGCAGCTGGCAGTGGAAAGATGGCA GCATTCTGAGCCCCAACCTGCTGACCATTATTGAAAT GCAGAAAGCGATTGCGCGCTGTATGCGAGCAGCTT AAAGGCTATATTGAAAAC TGCAAGCACCCGAACACCT ATATTGCTGAGCGCACCGTG	103
	鼠 NKG2D MALIRDRAKSHHSEMSKCHNYDLKPAKWDTSEQQQKQ RLALITTSQPGENGIIRGRYPIEKLKISPMFVVRVLIAIALAI RFTLNLTMWLAIFKETFPVLCNKEPVSSREGYCGPC PNNWICHRRNNCYQFFNEEKTNQSQASCLSQNSSLKI YSKEEQDFLKLVSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSL	104

	SYNQLTLVEIPKGSCAVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMK RAV	
鼠 NKG2D	ATGGCGCTGATTCGCGATCGCAAAAGCCATCATAGCG AAATGAGCAAATGCCATAACTATGATCTGAAACCGGC GAAATGGGATACCAGCCAGGAACAGCAGAAACAGCG CCTGGCGCTGACCACCAGCCAGCCGGCGAAAACGG CAITTATTCGCGGCCGTATCCGATTGAAAAACTGAAA ATTAGCCCAGTGTGTTGGTGCCTGCTGGCGATTG CGCTGGCGATTCGCTTACCCCTGAACACCCCTGATGTG GCTGGCGATTAAAGAAACCTTCAGCCGGTGCTG TGCAACAAAGAAGTGCCTGAGCAGCCCGAAGG CTATTGCGGCCGTGCCGAACAACCTGGATTGCCAT CGCAACAACTGCTATCAGTTAAACGAAGAAAAAA CCTGGAACCAGAGCCAGGGAGCTGCCAGGCCAGA ACAGCAGCCTGCTGAAAATTATAGCAAAGAAGAAC AGGATTCTGAAACTGGTGAAGAGCTATCATTGGAT GGGCCTGGTGCAGATTCCGGCAACGGCAGCTGGCA GTGGGAAGATGGCAGCAGCCTGAGCTATAACCAGCT GACCCTGGTGGAAATTCCGAAAGGCAGCTGCCGGT GTATGGCAGCAGCTTAAAGCGTATACCGAAGATTGC GCGAACCTGAACACCTATATTGCATGAAACGCGCG TG	105
[0795]	CD28 YMNM	YMNM
	CD28 PYAP	PYAP
	CD28 FMNM	FMNM
	CD28 AYAA	AYAA
	信号肽	ATMGWSCIILFLVATATGVHS
	信号肽 DNA 序列	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAAC AGCTACCGGTGTGCACTCC
	抗 CD20 (GA101) 重链	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	抗 CD20 (GA101) 轻链	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCAQNLEPYTFGGGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK

	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
抗 FAP(4B9) PGLALA 重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGFNWGGQTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	114
抗 FAP(4B9) 轻链	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYAWYQQ KPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	115
抗 CEA (A5B7) PGLALA 重链 [0796]	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWV RQAPGKGLEWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRTISRD DSKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWG QGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNST YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI KAKGQPBPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	116
抗 CEA (A5B7) 轻链	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQ QKPGSPQQYLLRYKSDSDKQQGSVSSRFSASKDASAN AGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTV LRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	117
抗 CEA (T84.66LCHA) PGLALA 重链	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWV RQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWG QGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVV	118

[0797]

	VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTS KAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
抗 CEA (T84.66LCHA) 轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWY QQKPGQAPRLLIYRASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL SKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	119
抗 CEA (CH1A1A98/992F1) PGLALA 重链	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFEGMNW VRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTD TSTSTAYMELRSRLSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDY WGQGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLCAVKGFY PSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	120
抗 CEA (CH1A1A98/992F1) 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASA AVGTYVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCHQYYT YPLFTFGQGTKEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL SKADYEKHKV ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	121
抗 CEA (hMN14) PGLALA 重链	EVQLVESGGVVQPGRSRLS C S ASGFDFTTYWMSWV RQAPGKGLEWIGEIH PDSSTINYAPSLKDRFTISRDNAK NTLFLQMDSL RPEDTG VYFCASLYFGFPWFAYWGQGTP VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAK GQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	122
抗 CEA (hMN14) 轻链	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGT SVAWYQQK PGKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG	123

说 明 书

CN 110662560 B

115/116 页

	NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
抗 TNC (2B10) PGLALA 重链	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYGYAYYGAFDYWGQQ TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVV VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPVQVCTLPPSRDELTKNQVSLCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	124
抗 TNC (2B10) 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQ KPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLT QPEDFATYYCLQNGLQPATFGQGTKVEIKRTVAAPS FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	125
抗 HER2 (PER) PG LALA 重链 1 [0798]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWV RQAPGKGLEWADVNPNSSGSIYNQRFKGRFTLSVDR SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSV VPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVV DVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTY RVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPVQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	126
抗 HER2 (PER) 轻链 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDV SIGVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSSRFSGSGSGTDFTLT QPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	127
抗 HER2 (PER) PG LALA 重链 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWV RQAPGKGLEWADVNPNSSGSIYNQRFKGRFTLSVDR SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSV VPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVV	128

[0799]

	DVSHEDEXVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTY RVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
抗 HER2 (PER) 轻链 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDV SIGVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRTGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTL SKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	129
人 IgG1 Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVN HKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	130

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司(F. Hoffmann-La Roche Ltd)
<120> 改进的抗原结合受体
<130> P34178
<160> 130
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗 P329G CDR H1 Kabat
<400> 1
Arg Tyr Trp Met Asn
1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗 P329G CDR H2 Kabat
<400> 2
[0001] Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗 P329G CDR H3 Kabat
<400> 3
Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser
1 5 10
<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗 P329G CDR L1 Kabat
<400> 4
Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10
<210> 5

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 P329G CDR L2 Kabat
 <400> 5
 Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 P329G CDR L3 Kabat
 <400> 6
 Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
 1 5
 <210> 7
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 [0002] <223> 抗 P329G-ds-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物 pETR17096
 <400> 7
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
 130 135 140
 Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp

	165	170	175
Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr			
180	185	190	
Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile			
195	200	205	
Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu			
210	215	220	
Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly			
225	230	235	240
Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val			
245	250	255	
Leu Val Val Val Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr			
260	265	270	
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu			
275	280	285	
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg			
290	295	300	
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg			
305	310	315	320
Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln			
325	330	335	
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu			
[0003]	340	345	350
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly			
355	360	365	
Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln			
370	375	380	
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu			
385	390	395	400
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr			
405	410	415	
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro			
420	425	430	
Arg			
<210> 8			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗 P329G-ds VH			
<400> 8			
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr			

20	25	30	
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu			
50	55	60	
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
115			
<210> 9			
<211> 109			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗 P329G-ds VL			
<400> 9			
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu			
[0004] 1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser			
20	25	30	
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly			
35	40	45	
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe			
50	55	60	
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala			
65	70	75	80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn			
85	90	95	
His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
100	105		
<210> 10			
<211> 248			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗 P329G-ds-scFv			
<400> 10			
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr			

20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
115	120	125
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr		
130	135	140
Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr		
145	150	155
Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp		
165	170	175
Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr		
180	185	190
Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile		
[0005] 195	200	205
Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu		
210	215	220
Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly		
225	230	235
Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
245		
<210> 11		
<211> 27		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CD28ATM		
<400> 11		
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu		
1	5	10
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val		
20	25	
<210> 12		
<211> 41		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> CD28CSD
<400> 12
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40
<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD3zSSD
<400> 13
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
[0006] 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> 14
<211> 180
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD28ATM-CD28-CD3z
<400> 14
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
20 25 30
Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
35 40 45
Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
50 55 60
Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala

65	70	75	80
Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg			
85	90	95	
Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu			
100	105	110	
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn			
115	120	125	
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met			
130	135	140	
Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly			
145	150	155	160
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala			
165	170	175	
Leu Pro Pro Arg			
180			
<210> 15			
<211> 238			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> eGFP			
<400> 15			
[0007] Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val			
1	5	10	15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu			
20	25	30	
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys			
35	40	45	
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu			
50	55	60	
Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln			
65	70	75	80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg			
85	90	95	
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val			
100	105	110	
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile			
115	120	125	
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn			
130	135	140	
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly			
145	150	155	160
Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val			
165	170	175	
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro			

	180	185	190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser			
195	200	205	
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val			
210	215	220	
Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			
225	230	235	
<210> 16			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> (G4S)4 接头			
<400> 16			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly			
1	5	10	15
Gly Gly Gly Ser			
20			
<210> 17			
<211> 5			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
[0008] <220>			
<223> G4S 接头			
<400> 17			
Gly Gly Gly Gly Ser			
1	5		
<210> 18			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> T2A 接头			
<400> 18			
Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn			
1	5	10	15
Pro Gly Pro			
<210> 19			
<211> 1356			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗 P329G-ds-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物 pETR17096			
<400> 19			

atgggatgga gctgttatcat ccttttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgag	60
gtgaagctgc tggagagcgg cggcgccctg gtgcagcccg gcggcagcct gaagctgagc	120
tgcggccca gccgcgttcga cttcagcagg tactggatga actgggttag gcaggcccc	180
ggcaagtgtc tggagtggat cggcgagatc acccccaca gcagcaccat caactacacc	240
cccagcctga aggacaagg catcatcagc agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg	300
cagatgatca aggtgaggag cgaggacacc gcctgtact actgcgttag gcctacagac	360
tacggcgccct ggttcgcccag ctggggccag ggcaccttgg tgaccgttag cgccggaggg	420
ggcggaaagt gtggcggggg aagcggcggg ggtggcagcg gagggggcgg atctcagggcc	480
gtggtgaccc aggagagcgc cctgaccacc agccccggcg agaccgtgac cctgacctgc	540
aggagcagca cggcgccgt gaccaccage aactacgcca actgggtgca ggagaagccc	600
gaccacctgt tcaccggcct gatcgccggc accaacaaga gggcccccgg cgtgcccggcc	660
agtttcagcg gcagcctgat cggcgacaag gccgccttga ccatcacccgg cgcccgacc	720
gaggacgagg ccatctactt ctgcgccttgg tacatcagca accactgggt ttccggctgt	780
ggcaccaagc tgaccgtgt gggagggggc ggatccttct ggggtgtggt ggtggtggc	840
ggcgtgtgg cctgctacag cctgctggtag accgtggct tcatcatctt ctgggtgagg	900
agcaagagga gcaggctgt gcacagcgac tacatgaaca tgaccccccag gagggccggc	960
ccaccaggaa agcactacca gccctacgcc ccccccagg acttcgcgccttgc ctacaggagc	1020
agggtgaagt tcagcaggag cgccgacgccc cccgccttacc agcaggggca gaaccagctg	1080
tataacgagc tgaacctggg caggaggag gagtaacgacg tgctggacaa gagggggc	1140
agggaccccg agatggcgg caagcccagg aggaagaacc cccaggaggg cctgtataac	1200
gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagagg	1260
aggagggca agggccacga cggcctgtac caggccttga gcacccgcac caaggacacc	1320
[0009] tacgacgccc tgcacatgca ggcctgccc cccagg	1356
<210> 20	
<211> 357	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗 P329G-ds VH	
<400> 20	
gaggtgaagc tgctggagag cggcgccggc ctggtgtagc ccggcgccag cctgaagctg	60
actgcgcggcccg ccagcggctt cgacttcage aggtactggta tgaactgggt gaggcaggcc	120
cccgcaagt gtctggagt gatcgccggat atcacccccc acagcagcac catcaactac	180
acccccagcc tgaaggacaa gttcatcatc agcaggagaca acgccaagaa caccctgtac	240
ctgcagatga tcaaggttag gagcggaggac accgcctgt actactgcgt gaggccctac	300
gactacggcg cctgggttgc cagctggggc caggcacccc tggtgaccgt gagcgcc	357
<210> 21	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗 P329G-ds VL	
<400> 21	
caggccgtgg tgacccagga gagcgccctg accaccagcc cggcgagac cgtgaccctg	60
actgcgaggaa gcagcaccgg cggcgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggag	120

aagcccgacc acctgttac cggcctgate ggccgcacca acaagaggc cccggcgta ccgcgcagg tcagcgccag cctgatcgcc gacaaggccg ccctgaccat cacggcgcc cagaccgagg acgaggccat ctacttgc gcctgttgtt acagcaacca ctgggtttc ggctgtggca ccaagctgac cgtgctg	180 240 300 327
<210> 22	
<211> 799	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗 P329G-ds-scFv	
<400> 22	
atggatgga gctgttatcat ccttttttg gtagcaacag ctaccgggt gtattccgag gtgaagctgc tggagagcgg cggcgccctg gtgcagcccc gggcagccct gaagctgagc tgcgcgccta gcccgttcga cttcagcagg tactggatga actgggttag gcaggcccc ggcaagtgtc tggagtggat cggcgagatc acccccgaca gcagcaccat caactacacc cccagccctga aggacaagg catcatcagc agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg cagatgatca aggtgaggag cgaggacacc gcctgtact actgcgttag gccctacgac tacggcgct gttcgccag ctggggccag ggcaccctgg tgaccgttag cgccggagg ggcggaaagt gtggcggggg aagcggcggt ggtggcagcg gagggggcggt atctcaggcc gtggtagcc aggagagcgc cctgaccacc agcccccgg agaccgtgac cctgacctgc aggagcagca cggcgccgt gaccaccatc aactacgca actgggtgca ggagaagccc gaccacccgt tcaccggcct gatcgccggc accaacaaga gggcccccgg cgtcccccc agttcagcg gcagcctgat cggcgacaag gccgcctga ccatcaccgg cgcccgacc gaggacgagg ccatctactt ctgcgcctg tggtagcaca accactgggt ttggcgtgt ggcaccaca tgaccgtgc	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 799
[0010]	
<210> 23	
<211> 647	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> IRES EV71, 内部核糖体进入位点	
<400> 23	
cccgaaatggtaatcaac gatcaatagc aggtgtggca caccagtcat accttgcata agcacttctg ttccccggta ctgatgtatca ataggctgtc cgccggctg aaggagaaaa cgttcgttac ccgaccaact acttcgagaa gcttagtacc accatgaacg aggcagggtg ttgcgtctag cacaacccca gtgttagatca ggctgtatgag tcactgcaac ccccatgggc gaccatggca gtggctgcgt tggggccctg cccatggaga aatccatgg acgcttaat tctgacatgg tgtgaagtgc ctattgagct aactggtagt cctccggccc ctgattgcgg ctaatctaa ctgcggagca catgctcaca aaccagtggg tgggtgtcg taacggcaa ctctgcagcg gaaccgacta cttgggtgt ccgtgtttcc ttttattcct atattggctg cttatggta caataaaaaaaa gttgttacca tatagctatt ggattggcca tccgggtgc aacaggccaa ctgttaccc atttattggt ttgttaccat tatcactgaa gtctgtgatc actctcaaat tcatttgac cctcaacaca atcaaac	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 647
<210> 24	
<211> 81	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD28ATM	
<400>	24	
	ttttgggtgc tggtgggttgt tggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaaacatgt	60
	gccttattat ttttctgggt g	81
<210>	25	
<211>	123	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD28CSD	
<400>	25	
	aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccggccccc	60
	ggggccaccgc gcaagcattat ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgctcc	120
		123
<210>	26	
<211>	336	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
[0011]	<223> CD3z SSD	
<400>	26	
	agagtgaagt tcagcaggag cgccagacgcc cccgcgtacc agcaggccca gaaccagctc	60
	tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgtatg ttttggacaa gagacgtggc	120
	cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	180
	gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggccgagcgc	240
	cggagggcga agggccacga tggccttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc	300
	tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc	336
<210>	27	
<211>	540	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD28ATM-CD28-CD3z	
<400>	27	
	ttctgggtgc tggtgggttgt gggcggcgtc ctggcctgct acagcctgct ggtgaccgtc	60
	gccttcatca tcttctgggt gaggagcaag aggaggcaggc tgctgcacag cgactacatg	120
	aacatgaccc ccaggaggcc cggcccccacc aggaagcact accagcccta cggccccc	180
	aggacttcg cgcctacag gagcagggtg aagttcagca ggagcgcgcga cggccccc	240
	taccagcagg gccagaacca gctgtataac gagtgaacc tggcaggag ggaggatac	300
	gacgtgtgg acaagaggag gggcaggagc cccgagatgg gcccgaagcc caggagaaag	360
	aaccccccagg agggcctgta taacgagctg cagaaggaca agatggccga ggcctacagc	420
	gagatggcga tgaagggcga gaggaggagg ggcaaggccc acgacggcct gtaccaggc	480

ctgagcacccg ccaccaagga cacctacgac gcctgcaca tgcaggccct gccccccagg	540
<210> 28	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> T2A 元件	
<400> 28	
tccggagagg gcagaggaag tttcttaaca tgcgtgacg tggaggagaa tccggccct	60
agg	63
<210> 29	
<211> 717	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> eGFP	
<400> 29	
gtgagcaagg gcgaggagct gttcacccgg gtggtgccta tcctggtcga gctggacggc	60
gacgtaaacg gccacaagg t cagcgttcc ggcgaggcg aggccatgc cacctacggc	120
aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gcccaccctc	180
gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc tttagccgtt accccgacca catgaagcag	240
cacgacttct tcaagtcgc catgcccggaa ggctacgtcc aggagcgcac cattttttc	300
[0012] aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgc gaggtaagt tcgagggcga caccctggtg	360
aaccgcattcg agctgaagg catgacttc aaggaggacg gcaacatcct gggcacaag	420
ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc	480
atcaaggta acttcaagat ccgcacaac atcgaggacg gcagcgtgca gtcgcccac	540
cactaccaggc agaacaccccatcgccgac ggcccccgtgc tgctgcccga caaccactac	600
ctgagcaccc agtccgcctt gagcaaagac cccaaacgaga agcgcgatca catggctctg	660
ctggagttcg tgaccggcgc cggatact ctggcatgg acgagctgta caagtga	717
<210> 30	
<211> 2136	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗 P329G-ds-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP 融合物 pETR17096	
<400> 30	
atgggatgga gctgttatcat ccttttttgg ttagcaacag ctaccgggtgt gcattccgag	60
gtgaagctgc tggagagcgg cggccgcctg gtgcagcccg gcggcagccct gaagctgagc	120
tgcgcgcaca gggcttcga cttcagcagg tactggatga actgggttag gcaggcccc	180
ggcaagtgtc tggagtggat cggcgagatc acccccgaca gcagcaccat caactacacc	240
cccaaggctga aggacaaggat catcatcage agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg	300
cagatgatca aggtgaggag cgaggacacc gcctgtact actgcgttag gcctacgac	360
tacggcgcctt gttcgccag ctggggccag ggcaccctgg tgaccgttag cgccggagg	420
ggcggaaatg gtggcgaaaa aagcggcgaa ggtggcagcg gagggggcgg atctcaggcc	480
gtggtagcccc aggagagcgc cctgaccacc agccccggcg agaccgtgac cctgaccctgc	540

[0013]	aggagcagca ccggcgccgt gaccaccagg aactacgcca actgggtgca ggagaagccc gaccacctgt tcaccggct gatcgccggc accaacaaga gggcccccgg cgtcccccc agttcagcg gcagcctgat cggcacaag gcccgcctga ccatcacccgg cgcccagacc gaggacgagg ccatctactt ctgcgcctg tggtagcagca accactgggt gttcggtgt ggcaccaagc tgaccgtgt gggagggggc ggatccttct gggtagctgt ggtggtaggc ggcgtgtgg cctgctacag cctgctgtg accgtggct tcatacatctt ctgggtgagg acaagagga gcaggctgct gcacagcag tacatgaaca tgaccccccag gaggccggc ccaccaggaa agcactacca gcccatacgcc ccccccaggg acttcgcccgc ctacaggac aggtaagt tcagcaggag cgccgacgccc cccgcctacc agcaggccca gaaccagctg tataacgagc tgaacctggg caggagggag gagtagcagc tgctggacaa gaggagggc aggaccccg agatggcgaa caagccagg aggaagaacc cccaggaggg cctgtataac gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc tacagcaga tcggcatgaa gggcgagagg aggagggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcacccacca caaggacacc tacgacgccc tgcacatgca gcccctgccc cccaggtccg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgca gtgacgtgga ggagaatccc gcccctaggg tgagcaaggg cgaggagctg ttcacgggg tggtagccat cctggcgtgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagtcc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca acgtgaccct gaagttcatc tgcaccaccc gcaagctgcc cgtgcctgg cccaccctcg tgaccaccct gacccatggc gtcagtgtct tcaagccgcta ccccgaccat atgaagcagc acgacttctt caagtccccc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc attttttca aggacgcacgg caactacaag acccgcgcgg aggtgaagt cgagggcgc accctggta accgcacgca gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatctg gggcacaacgg tggagttacaa ctacaacacg cacaacgtct atatcatggc cgacaaggcag aagaacggca tcaagggtgaa cttcaagatc cccccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcggacc actaccacca gaacacccccc atggcgacg gccccgtgt gctgcccgc accactacc tgagcacccca gtccgcctg	600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380 1440 1500 1560 1620 1680 1740 1800 1860 1920 1980 2040
	agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggcctgc tggagttcgt gaccgcgc gggateactc tcggcatgga cgagctgtac aagtga <210> 31 <211> 433 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 抗 P329G-scFv- CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物 <400> 31 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr 20 25 30 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45 Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu 50 55 60 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	2100 2136

Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
 130 135 140
 Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
 165 170 175
 Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr
 180 185 190
 Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile
 195 200 205
 Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu
 210 215 220
 Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val
 245 250 255
[0014] Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
 260 265 270
 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
 275 280 285
 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
 290 295 300
 Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
 305 310 315 320
 Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 325 330 335
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 340 345 350
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 355 360 365
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 370 375 380
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 385 390 395 400
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 405 410 415
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 420 425 430
 Arg

<210> 32
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 P329G VH
 <400> 32

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

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Arg	Tyr
					20			25					30		

Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					35			40					45		

Gly	Glu	Ile	Thr	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Ile	Asn	Tyr	Thr	Pro	Ser	Leu
					50			55					60		

Lys	Asp	Lys	Phe	Ile	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
					65			70			75		80		

Leu	Gln	Met	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
					85			90					95		

Val	Arg	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Ala	Trp	Phe	Ala	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly
					100				105				110		

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala									
[0015]					115										

<210> 33
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 P329G VL
 <400> 33

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

Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
					20			25					30		

Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Asp	His	Leu	Phe	Thr	Gly
					35			40			45				

Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe
					50			55			60				

Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala
					65			70			75		80		

Gln	Thr	Glu	Asp	Glu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
					85			90					95		

His	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu				
					100			105							

<210> 34
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 P329G-scFv
 <400> 34

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

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Arg	Tyr
					20				25				30		

Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					35			40				45			

Gly	Glu	Ile	Thr	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Ile	Asn	Tyr	Thr	Pro	Ser	Leu
					50			55			60				

Lys	Asp	Lys	Phe	Ile	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
					65			70			75			80	

Leu	Gln	Met	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
					85			90			95				

Val	Arg	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Ala	Trp	Phe	Ala	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly
					100			105			110				

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
[0016]					115			120			125				

Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr		
					130			135			140				

Gln	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ser	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Thr
					145			150			155			160	

Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp
					165			170			175				

Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Asp	His	Leu	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr
					180			185			190				

Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile
					195			200			205				

Gly	Asp	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Thr	Glu	Asp	Glu
					210			215			220				

Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	His	Trp	Val	Phe	Gly
					225			230			235			240	

Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu								
								245							

<210> 35
 <211> 1356
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 P329G-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物

	<400>	35					
[0017]	atggatgga	gctgttatcat	cctcttcttg	gtagcaacag	ctaccggtgt	gcattccgag	60
	gtgaagctgc	tggagagcg	cgccggctg	gtgcagccc	gcccgcgcct	gaagctgac	120
	tgcgcccca	gcccgttcga	cttcagcagg	tactggatga	actgggttag	gcaggcccc	180
	ggcaagggtc	tggagtggat	cggcgagatc	acccccgaca	gcagcacat	caactacacc	240
	cccagctga	aggacaagg	catcatcage	agggacaacg	ccaagaacac	cctgtacctg	300
	cagatgtca	aggtgaggag	cgaggacacc	gccctgtact	actgcgttag	gccctacac	360
	tacggcgct	gttgcgcag	ctggggccag	ggcacccctgg	tgaccgttag	cgccggagg	420
	ggcggaaatg	gtgggggggg	aagcggcg	ggtggcagcg	gagggggcg	atctcaggcc	480
	gtggtgaccc	aggagagcgc	cctgaccacc	agccccggcg	agaccgtgac	cctgacctgc	540
	aggagcagca	cggcgccgt	gaccaccagc	aactacgca	actgggtgca	ggagaagccc	600
	gaccacctgt	tcaccggcct	gatcgccggc	accaacaaga	gggccccgg	cgtcccccc	660
	agttcagcg	gcagcctgat	cggcgacaag	ggcccccgt	ccatcacccg	cgcccagacc	720
	gaggacgagg	ccatctactt	ctgcgcctg	tggtacagca	accactgggt	gttcggcggt	780
[0017]	ggcaccaagc	tgaccgtgct	gggagggggc	ggatccttct	gggtgctgg	ggtggtggc	840
	ggcgtgtgg	cctgctacag	cctgctgg	accgtggct	tcatcatctt	ctgggtgagg	900
	agcaagagga	gcaggctgct	gcacagcgac	tacatgaaca	tgaccccccag	gaggccccgg	960
	ccaccagg	agcactacca	ggccctacgc	ccccccaggg	acttcggccgc	ctacaggac	1020
	aggtaagt	tcaagcggag	cggcgacg	cccgcctacc	agcaggggca	gaaccagctg	1080
	tataacgagc	tgaacctggg	caggagggag	gagtacgac	tgctggacaa	gaggagggc	1140
	agggaccccg	agatggcg	caagccagg	aggaagaacc	cccaggagg	cctgtataac	1200
	gagctgcaga	aggacaagat	ggccgaggcc	tacagcgaga	tcggcatgaa	ggcgcagagg	1260
	aggagggca	agggccacga	cggcctgtac	cagggcctg	gcaccgcccac	caaggacacc	1320
	tacgacccc	tgcacatgca	ggccctgccc	cccagg			1356
	<210>	36					
	<211>	357					
	<212>	DNA					
[0017]	<213>	人工序列					
	<220>						
	<223>	抗 P329G VH					
	<400>	36					
	gaggtgaagc	tgctggagag	cggcgccggc	ctgggtgcagc	ccggcgccag	cctgaagctg	60
	agctgcgc	ccagcgcc	cgacttcagc	aggtactgg	tgaactgggt	gaggcaggcc	120
	cccgcaagg	gtctggagt	gatcgccg	atcaccc	acagcagcac	catcaactac	180
	accccccagcc	tgaaggacaa	gttcatcatc	agcagg	acgccaagaa	caccctgtac	240
	ctcgacatg	tcaagggtg	gagcgaggac	accgcctgt	actactgcgt	gaggccctac	300
	gactacggcg	cctgggtcgc	cagctggggc	caggcaccc	tggtgaccgt	gagcgcc	357
	<210>	37					
	<211>	327					
	<212>	DNA					
	<213>	人工序列					
	<220>						
	<223>	抗 P329G VL					
	<400>	37					

caggccgtgg tgacccagga gagcgcctg accaccagcc cggcgagac cgtgaccctg	60
acctgcagga gcagcacccg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggag	120
aaggccgacc acctgttac acggcgtgate ggcccacca acaagggc cccggcgtg	180
cccgccaggt tcagggcag cctgatggc gacaaggccg ccctgaccat caccggcgc	240
cagaccgagg acgaggccat ctacttctgc gcctgttgt acagcaacca ctgggtttc	300
ggcggtggca ccaagctgac cgtgctg	327
<210> 38	
<211> 2136	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗 P329G-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP 融合物	
<400> 38	
atgggatgga gctgttatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccgggtgt gcattccgag	60
gtgaagctgc tggagagcgg cggcgccctg gtgcagcccg gcggcagcct gaagctgagc	120
tgcggccca gcccgttcga cttcagcagg tactggatga actgggttag gcaggcccc	180
ggcaagggtc tggagtggat cggcgagatc acccccaca gcagcaccat caactacacc	240
cccagcctga aggacaagtt catcatcage agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg	300
cagatgatca aggttggggag cgaggacacc gcctgtact actgcgttag gcctacgac	360
tacggccct gtttcgcccag ctggggccag ggcacccctgg tgaccgttag cgccggaggg	420
ggcggaaatg gtggcggggg aagcggcggg gttggcagcg gagggggcgg atctcaggcc	480
gtgggtgaccc aggagagcgc cctgaccacc agcccccggc agaccgtgac cctgacctgc	540
[0018] aggagcagca cggcgccgt gaccaccage aactacgca actgggtgca ggagaagccc	600
gaccacctgt tcaccggcct gatcgccggc accaacaaga gggcccccgg cgtgcccggc	660
agttcagcg gcagcctgat cggcgacaag gcccctgta ccatcaccgg cgcccagacc	720
gaggacgagg ccatctactt ctgcgcctg tggtagcaca accactgggt ttgcggcggt	780
ggcaccaagc tgaccgtgct gggagggggc ggatccctt gggtagtgggt ggtggggc	840
ggcgtgtgg cctgctacag cctgctggc accgtggcct tcatcatctt ctgggtgagg	900
agcaagagga gcaggctgt gcacagcgac tacatgaaca tgaccccccag gagggccggc	960
cccaccagga agcactacca gcccatacgcc ccccccagg acttcggccgc ctacaggacc	1020
agggtgaagt tcagcaggag cggcgacgcc cccgcctacc agcaggccca gaaccagctg	1080
tataacgagc tgaacctggg caggaggag gatcagcagc tgctggacaa gagggggc	1140
agggaccccg agatggcgg caagcccagg aggaagaacc cccaggaggg cctgtataac	1200
gagctgcaga aggacaagat gggcgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagagg	1260
aggagggca agggccacga cggcctgtac caggccctga gcacccggcac caaggacacc	1320
tacgacgccc tgcacatgca gcccctgccc cccaggtccg gagaggccag aggaagtctt	1380
ctaacatgctg gtgacgtgaa ggagaatccc gcccctaggg tgaccaaggg cgaggagctg	1440
ttcacgggg tggtagcccat cctggcgtag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc	1500
acggtgtccg gcgaggccga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc	1560
tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgcctgg cccaccctcg tgaccaccct gacccatggc	1620
gtgcagtgtc tcaagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtcgc	1680
atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttctca aggacgacgg caactacaag	1740
acccgcggc aggtgaagg tggatggcacc accctggta accgcacatcg gctgaaggc	1800
atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagg tggatgacaa ctacaacagc	1860
cacaacgtct atatcatggc cgacaacgac aagaacggca tcaaggtaaa cttcaagatc	1920

cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcggacc actaccagca gaacacccc		1980
atcggcgacg gccccgtct gctgcccac aaccactacc tgagcaccca gtccgcctg		2040
agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggcctgc tggagttcgt gaccgcccc		2100
gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtga		2136
<210> 39		
<211> 407		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗 P329G-ds-Fab- 重链-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物		
pETR17100		
<400> 39		
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr		
20 25 30		
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile		
35 40 45		
Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu		
50 55 60		
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65 70 75 80		
[0019] Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly		
100 105 110		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115 120 125		
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130 135 140		
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145 150 155 160		
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165 170 175		
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180 185 190		
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195 200 205		
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly		
210 215 220		
Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys		
225 230 235 240		
Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser		
245 250 255		
Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg		

	260	265	270
Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg			
	275	280	285
Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp			
	290	295	300
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn			
	305	310	315
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg			
	325	330	335
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly			
	340	345	350
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu			
	355	360	365
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
	370	375	380
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His			
	385	390	395
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			400
	405		
<210> 40			
<211> 222			
<212> PRT			
[0020] <213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗P329G-ds-Fab 重链			
<400> 40			
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
	1	5	10
			15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr			
	20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu			
	50	55	60
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
	65	70	75
			80
Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			

145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
210	215	220	
<210> 41			
<211> 216			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> Anti P329G-ds-Fab 轻链			
<400> 41			
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu			
1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser			
20	25	30	
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly			
35	40	45	
[0021]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe		
	50	55	60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala			
65	70	75	80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn			
85	90	95	
His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val			
100	105	110	
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys			
115	120	125	
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg			
130	135	140	
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn			
145	150	155	160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
165	170	175	
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
180	185	190	
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
195	200	205	
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		
<210> 42			

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CL
 <400> 42

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> 43
 <211> 103

[0022] <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CH1
 <400> 43

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

<210> 44
 <211> 2645
 <212> DNA
 <213> 人工序列

〈220〉

〈223〉 抗 P329G-ds-Fab-重链-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物

pETR17100

<400> 44

atgggatcca gctgttatcat cctttcttg gtagcaacag ctacgggtgt gcattccag
gccgtggta cccaggagag cgccctgacc accagcccc gcgagaccgt gaccctgacc
tgcaggagca gcacccggcgc cgtgaccacc agcaactacg ccaactgggt gcaggagaag
cccgaccacc tgttcacccg cctgatcgcc ggcaccaaca agagggcccc cggcgtgccc
gccaggttca gggcagcct gatcgccgac aaggccgccc tgaccatcac cggcccccag
accgaggacg aggccatcta ctctcgcc ctgtggtaca gcaaccactg ggtgttcggc
tgtggcacca agctgaccgt gctgcgtacg gtggctgac catctgtt catctcccg
ccatctgatg agcagttaat atctggaact gcctctgtt tgtgcctgct gaataacttc
tatcccagag aggccaaagt acagtggaaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc
caggagagt tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagccttag cagcacccctg
acgctgagca aagcagacta cgagaaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag
ggcctgagct cgccgtcac aaagagctt aacaggggag agtgttagga attccccaa
gtaaacttga agctgtaaat caacgatcaa tagcagggt ggcacaccag tcatacctt
atcaagcaact tctgttccc cggaactgagt atcaatagtc tgctcgccg gctgaaggag
aaaacgttgc ttacccgacc aactacttcg agaagcttag taccaccatg aacgaggcag
ggtgttgc tcagcacaac cccagtgtag atcaggctga tgagtcaactg caaccccat
gggcgaccat ggcagtggct gcgtggcgg cctgcccattt gagaatcca tgggacgctc
taattctgac atgggtgaa gtgcctattt agctacttgc tagtcctccg gcccctgatt
gcccccttgc tcataacttgcg agcacatgtt cacaaccatg tgggtgggt gtcgtacgg
gcaactctgc agcgaaaccc actactttgg gtgtccgtt ttcctttat tcctatattt
gctgcttgc gtgacaatca aaaagttgtt accatatagc tattggattt gccatccgg
gtgcaacagg gcaactgttt acctatttt tgggtttgtt ccattatcac tgaagtctgt
gatcactctc aaattcattt tgaccctcaa cacaatcaaa cggccaccatg ggatggagct
gtatcatctt cttcttgta gcaacagcta ccgggtgtca ctccgaggtt aagctgttgc
agagccggcgg cggccctggc cagccggcgc gcagcctgaa gctgagctgc gcccggcagcg
gcttcgactt cagcaggtac tggatgaact gggtgaggca ggccccccgc aagtgtctgg
agtggatcgg cgagatcacc cccgacagca gcaccatcaa ctacacccca aegctgaagg
acaagttcat catcagcagg gacaacgcca agaacaccct gtacactgcag atgatcaagg
tgaggagcga ggacaccgcg ctgtactact gctgaggccc ctacactac ggccctgg
tcgcccagctg gggccaggc accctggta ccgtgagcgc cgctagcacc aagggccccct
ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc gctctggc
gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgttc ctggaaacagc ggagccctga
cctccggcgt gcacacccctt cccggcgttc tgccatgtt tggcctgtt agcctgagca
gctgtgtcac cgtgccttcc agcagcctgg gcaccacccatc ctacatctgc aacgtgaacc
acaagccccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc ggagggggcg
gatccttcgt ggtgtgggt gttggggcgc gctgtgtggc ctgtacagc ctgtgtgt
ccgtggccctt catcatcttc tgggtgagga gcaagaggag caggctgtg cacagcact
acatgaacat gaccccaagg agggccggcc ccaccaggaa gcactaccag ccctacgccc
ccccccaggaa ctgcggcc tacaggagca gggtaaggat cagcaggagc gccgacgccc
ccgcctacca gcagggccag aaccagctgt ataacgagct gaacctggc aggagggagg
atcagactgt gctggacaag aggagggcga gggaccccgat gatggggcgc aagcccgagg

ggaagaaccc	ccaggagggc	ctgtataacg	agctgcagaa	ggacaagatg	gccgaggcct	2520
acagcgagat	cggcatgaag	ggcgagagga	ggaggggcaa	gggccacgac	ggcctgtacc	2580
agggccttag	caccgccacc	aaggacacct	acgacgcct	gcacatgcag	gccctgcccc	2640
ccagg						2645
<210>	45					
<211>	324					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	CL					
<400>	45					
cgtacggtgg	ctgcaccate	tgtttcata	ttccgcatt	ctgatgagca	gttgaatct	60
ggaactgcct	ctgttgtgt	cctgctaat	aacttctatc	ccagagggc	caaagtacag	120
tggaagggtgg	ataacgcctt	ccaatcggtt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcage	accctgacgc	tgagcaaagg	agactacgag	240
aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtccacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	tttag				324
<210>	46					
<211>	309					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
[0024]	<223>	CH1				
<400>	46					
gctagcacca	agggcccttc	cgtgttcccc	ctggccccc	gcagcaagag	caccagcgcc	60
ggcacagccg	ctctggctg	cctggtaag	gactacttc	ccgagcccgt	gaccgtgtcc	120
tggaacacgct	gagccctgac	ctccggctg	cacaccccttcc	ccgcccgtgt	gcagagttct	180
ggcctgtata	gcctgagcag	cgtggtcacc	gtgccttcta	gcagcctggg	cacccagacc	240
tacatctgca	acgtgaacca	caagcccagg	aacaccaagg	tggacaagaa	ggtggagccc	300
aagagctgc						309
<210>	47					
<211>	3425					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	抗 P329G-ds-Fab-重链-CD28TM-CD28CSD-CD3ZSSD-eGFP 融合物					
	pETR17100					
<400>	47					
atggatgga	gctgttatcat	ccttttttg	gtagcaacag	ctacgggtgt	gcattccag	60
gccgtggta	cccaggagag	cgcctgtacc	accagccccg	gcgagaccgt	gaccctgacc	120
tgcaggagca	gcaccggcgc	cgtgaccacc	agcaactacg	ccaactgggt	gcaggagaag	180
cccgaccacc	tgttcacccgg	cctgatggc	ggcaccaaca	agagggcccc	cggcgtgccc	240
gccaggtca	gccccggcct	gatcgccgac	aaggccccc	tgaccatcac	cgccgcccag	300
accgaggacg	aggccatcta	cttctgcgcc	ctgtggtaac	gcaaccactg	ggtgttcggc	360
tgtggccacca	agctgaccgt	gctgcgtacg	gtggctgcac	catctgtctt	catttcccg	420

ccatctgatg	agcagttgaa	atctggact	gcctctgtt	tgtgcctgct	gaataacttc	480
tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaaag	gtggataaeg	ccctccaate	ggtaactcc	540
caggagagt	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagccttag	cagcacccctg	600
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	caccatcatag	660
ggcctgagct	cggcgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgttagga	attccccgaa	720
gttaacttaga	agctgtaaat	caacgatcaa	tagcagggt	ggcacaccag	tcataccttg	780
atcaaggact	tctgtttccc	cggactgagt	atcaataggc	tgctcgcg	gctgaaggag	840
aaaacgttgc	ttacccgacc	aactacttcg	agaagcttag	taccaccatg	aacgaggccag	900
ggtgttcgc	tcagcacaac	cccagtgtag	atcaggctga	tgagtactg	caacccccat	960
gggcgaccat	ggcagtggct	gcgttggcg	cctgcccatt	gagaatcca	tgggacgctc	1020
taattctgac	atggtgtgaa	gtgcctattt	agctaactgg	tagtctccg	gccctgtatt	1080
geggctaate	ctaactgcgg	ageacatgtc	cacaaacceg	tgggtgggt	gtgttaacgg	1140
gcaactctgc	agcggAACCG	actactttgg	gtgtccgtt	ttccttttat	tcctatattt	1200
gctgcttatg	gtgacaatca	aaaagtttt	accatatacg	tattggattt	gccatccgg	1260
gtgcaacagg	gcaactgttt	acctatttt	tggtttttta	ccattatcac	tgaagtctgt	1320
gatcactctc	aaattcattt	tgaccctcaa	cacaatcaaa	cgccaccatg	ggatggagct	1380
gtatcatctt	cttcttggta	gcaacagcta	ccgggtgtca	ctccgagggt	aagctgtctgg	1440
agagcggcgg	cggccctgg	cagccggcg	gcagccgtaa	gctgagctgc	gcccccagcg	1500
gcttcgactt	cagcaggtac	tggatgaact	gggtgaggca	ggcccccggc	aagtgtctgg	1560
agtggatcgg	cgagatcacc	cccgacagca	gcaccatcaa	ctacaccccc	agcctgaagg	1620
acaagttcat	catcagcagg	gacaacgca	agaacacct	gtacctgcag	atgtatcaagg	1680
tgaggagcga	ggacaccggc	ctgtactact	gcgtgaggcc	ctacgactac	ggccctgtt	1740
tcgcccagct	gggcccaggc	accctggta	ccgtgaggc	cgctagcacc	aaggccccct	1800
ccgtgttccc	cctggccccc	agcagaaga	gcaccagcg	ccgcacagcc	gctctggct	1860
gcctggtcaa	ggactacttc	cccgagcccg	tgaccgttc	ctggaaacagc	ggagccctga	1920
cctccggcgt	gcacaccc	cccgccgtc	tgcaggtt	tggcctgtat	agcctgagca	1980
gcgtggtcac	cgtgccttc	agcagcctgg	gcacccagac	ctacatctgc	aacgtgaacc	2040
acaagccccag	caacaccaag	gtggacaaga	aggtggagcc	caagagctgc	ggagggggcg	2100
gatccttctg	ggtgcgttg	gtgtggggcg	gcgtgcttgc	ctgctacagc	ctgctgttg	2160
ccgtggcctt	catcatcttc	tgggtgagga	gcaagaggag	caggctgt	cacagcgact	2220
acatgaacat	gaccccccagg	aggccggcc	ccaccaggaa	gcactaccag	ccctacgccc	2280
ccccccaggga	cttcggcc	tacaggagca	gggtgaagtt	cagcaggagc	ggcgcacggcc	2340
ccgcctacca	gcagggccag	aaccagctgt	ataacgagct	gaacctggc	aggagggagg	2400
agtacgacgt	gctggacaag	aggaggggc	gggacccca	gatggggcgc	aagccccagga	2460
ggaagaaccc	ccaggagggc	ctgtataacg	agctgcagaa	ggacaagatg	gccgaggcc	2520
acagcgagat	cgccatgaag	ggcgagagga	ggagggccaa	ggccacacgac	ggcctgtacc	2580
aggccttgcag	caccggccacc	aaggacacct	acgacccct	gcacatgcag	gccctggccc	2640
ccaggtccgg	agagggcaga	ggaagtcttc	taacatggg	tgacgtgg	gagaatcccg	2700
gcccttagggt	gagcaagggc	gaggagctgt	tcaccgggt	ggtgcctatc	ctggcgtgac	2760
tggacggcga	cgtaaacggc	cacaagttca	gcgtgtccgg	cgagggcag	ggcgtatgcca	2820
cctacggcaa	gtgtaccctg	aagtcatct	gcaccacccg	caagctgccc	gtgcctggc	2880
ccaccctcg	gaccaccctg	acctacggcg	tgcaagtgc	cagccgtac	cccgaccacca	2940
tgaagcagca	cgacttcttc	aagtccgca	tgcccgaagg	ctacgtccag	gagcgcacca	3000
tcttcttcaa	ggacgacggc	aactacaaga	cccgccggc	ggtgaagttc	gagggcgaca	3060
ccctggtgaa	ccgcacatcgag	ctgaaggggc	tcgacttcaa	ggaggacggc	aacatcttgg	3120

ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaaggcaga
 agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc
 tcgcccacca ctaccagcag aacacccccca tcggcgacgg cccctgctg ctggccgaca
 accactacct gagcacccag tccgcctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca
 tggtcctgct ggagttcgta accggccggc ggatcactct cggcatggac gagctgtaca
 agtga
 <210> 48
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 P329G-Fab-重链-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物
 pETR17594
 <400> 48
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 [0026] Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 225 230 235 240
 Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser

	245	250	255
Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg			
260	265	270	
Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg			
275	280	285	
Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp			
290	295	300	
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn			
305	310	315	320
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg			
325	330	335	
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly			
340	345	350	
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu			
355	360	365	
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
370	375	380	
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His			
385	390	395	400
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
405			
<210> 49			
[0027] <211> 222			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗 P329G-Fab 重链			
<400> 49			
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr			
20	25	30	
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu			
50	55	60	
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			

	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
210	215	220	
<210> 50			
<211> 216			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗P329G-Fab 轻链			
<400> 50			
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu			
1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser			
20	25	30	
[0028] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly			
35	40	45	
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe			
50	55	60	
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala			
65	70	75	80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn			
85	90	95	
His Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val			
100	105	110	
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys			
115	120	125	
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg			
130	135	140	
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn			
145	150	155	160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
165	170	175	
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
180	185	190	
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
195	200	205	
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			

	210	215	
<210>	51		
<211>	2645		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	抗 P329G-Fab-重链-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物 pETR17594		
<400>	51		
[0029]	atgggatgga gctgttatcat cctttcttg gtagcaacag ctacgggtgt gcattccag gccgtggta cccaggagag cgccctgacc accagccccg gcgagaccgt gaccctgacc tgcaggagca gcaccggcgc cgtgaccacc agcaactacg ccaactgggt gcaggagaag cccgaccacc tggcacccgg cctgatggc ggcaccaaca agagggcccc cggcgtgccc gccagggtca gggcagcgc gatcgccgac aaggccccc tgaccatcac cggcgcagg accgaggacg aggccatcta cttctgegcc ctgtggtaca gcaaccactg ggtgttcggc ggtggcacca agctgaccgt gctgcgtacg gtggctgcac catctgtt catctcccg ccatctgtat agcagttgaa atctggact gcctctgtt tgtgcctgt gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagatg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccggtcac aaagagcttc aacaggggag agtggtagga attccccaa gtaaatcaga agctgtaaat caacgatcaa tagcagggtgt ggcacaccag tcataccttgc atcaaggact tctgtttccc cggactgagt atcaataggc tgctcgccg gctgaaggag aaaacgttcg ttacccgacc aactacttcg agaagcttag taccaccatg aacggccag ggtgtttcgc tcagcacaac cccagtgtag atcaggctga tgagtactg caaccccat ggcgaccat ggcagtggt gcgttggcgg cctgcccattg gagaatcca tgggacgctc taattctgac atgggtgttgc gtcctattt agctactgg tagtcctccg gcccctgatt ggggctaatac ctaactgccc agcacatgct cacaaccag tgggtgggtgt gtgttaacgg gcaactctgc agcggaaaccg actacttgg gtgtccgtgt ttccctttat tccatatattt gtctgttatg gtgacaatca aaaagtgtt accatatacg tattggattt gccatccgg gtgcaacagg gcaactgttt acctattttat tgggtttgtt ccattatcac tgaagtctgt gatcaacttc aaattcattt tgaccctcaa cacaatcaaa cggcaccatcg ggatggagct gtatcatcct cttcttggta gcaacagcta ccgggtgtca ctccgagggtg aagctgttgg agagccggcgg cggcctggc cagccggcg gcagccgtaa gctgagctgc gcccacagcg gtttcgactt cagcaggtaact tggatgaaact gggtgaggca ggccccggc aagggtctgg agtggatcgg cgagatcacc cccgacagca gcaccatcaa ctacacccccc agcctgaagg acaagttcat catcagcagg gacaacccca agaaccctt gtacctgcag atgatcaagg tgaggagcga ggacaccggc ctgtactact gcgtgaggcc ctacgactac ggcgcctgg tcgcccagctg gggccaggcc accctggta ccgtgagcgc cgctagcacc aaggccccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagccgg cggcacagcc gctctggc gcctggtaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggAACAGC ggagccctga cctccggcgt gcacacccctc cccgcccgtc tgcaagtttcc tggcctgtat agcctgac gcgtggtcac cgtgccttctt agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccg caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc ggagggggcg gtatccatcg ggtgtgggtg gtgggtggcg gcgtgctggc ctgctacage ctgtgttggta	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380 1440 1500 1560 1620 1680 1740 1800 1860 1920 1980 2040 2100 2160	

ccgtggcctt catcatcttc tgggtgagga gcaagaggag caggctgctg cacagcgact acatgaacat gacccccagg aggccccggc ccaccaggaa gcactaccag ccctacgccc cccccaggga ctgcggcc tacaggagca gggtaagtt cagcaggagc gccgacgccc ccgcctacca gcagggccag aaccagctgt ataacgagct gaacctggc aggagggagg agtacgacgt gctggacaag aggagggca gggaccccga gatggcggc aagcccagga ggaagaaccc ccaggagggc ctgtataacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct acagcgagat cggcatgaag ggcgagagga ggagggcaa gggccacgc ggcctgtacc aggcctgag caccgccacc aaggacacct acgacgcct gcacatgcag gccctgcccc ccagg	2220 2280 2340 2400 2460 2520 2580 2640 2645
<210> 52	
<211> 3425	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗 P329G-Fab-重链-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP 融合物 pETR17594	
<400> 52	
atgggatgga gctgttatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacgggtgt gcattccag gccgtgtga cccaggagag cgccctgacc accagccccg gcgagaccgt gaccctgacc tgccaggagca gcaccggcgc cgtgaccacc agcaactacg ccaactgggt gcaggagaag cccgaccacc tggtcacccgg cctgatggc ggcaccaaca agagggcccc cggcgtgccc gccaggttca gggcagcct gatggcgcac aaggccgccc tgaccatcac cggcgccag [0030] accgaggacg aggccatcta cttctgcgcc ctgtggtaca gcaaccactg ggtgttcggc ggtggcacca agctgaccgt gctgcgtacg gtggctgcac catctgtt catcttcccg ccatctgtat agcagttgaa atctggact gcctcttttgc ttgcctgtct gaataacttc tatcccagag aggc当地aaatc agacttggaa gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagatg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagccttag cagcaccctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cggccgtcac aaagacttcc aacaggggag agtggtagga attccccaa gttaacttgc agtggtaaat caacgatcaa tagcagggtgt ggcacaccag tcataccttgc atcaaggact tctgtttccc cggactgagt atcaataggc tgctcgccg gctgaaggag aaaacgttgc ttaccgcacc aactacttgc agaagcttag taccaccatg aacggcgg ggtgttgc tcagcacaac cccagttgtg atcaggctga tgagtactg caaccccat ggcgcaccat ggcagtggct gcgttggcgg cctgcccattt gagaatcca tgggacgctc taattctgac atgggtgaa gtgcctattt agctaactgg tagtgcctccg gcccctgatt gcccctaattc ctaactgcgg agcacatgtt cacaaccag tgggtgggtgt gtcgtaacgg gcaactctgc agcggaccg actacttgg gtgtccgtgt tcccttttgc tccatatttgc gtctgttatg gtgacaatca aaaagtgtt accatatgc tattggattt gccatccgg gtgcaacagg gcaactgtttt acctattttt tgggtttgtt ccattatcac tgaagtctgt gtatcacttca aaattcattt tgaccctcaa cacaatcaaa cggccaccatg ggatggagct gtatcatctt cttcttggta gcaacagctt ccgggtgtca ctccgagggtt aagctgtgg agagcggcgg cggccctggc cagccggcgc gcagcctgaa gctgagctgc gcccacgc gcttcgactt cagcaggatc tggatgaaact gggtgaggca gggccggcgg aagggtctgg agtggatcgg cgagatcacc cccgacagca gcaccatcaa ctacacccccc agcctgaagg acaagttcat catcagcagg gacaacccca agaaccacctt gtacatgcag atgatcaagg	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380 1440 1500 1560 1620 1680

[0031]	tgaggagcga ggacaccgcc ctgtactact gcgtgaggcc ctacgactac ggcgcctgg tcgcctcg gggccagggc accctggtga ccgtgagcgc cgcttagcacc aaggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc gctctggct gcctggtaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgc ctggaacagc ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgcgtgc tgcagatc tggctgtat agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc ggagggggcg gatccitctg ggtgctggtg gtgggtggcg gcgtgctggc ctgctacagc ctgctggta ccgtggcctt catcatcttc tgggtgagga gcaagaggag caggctgctg cacagcact acatgaacat gacccccagg aggccggcc ccaccaggaa gcactaccag ccctacgccc ccccccaggaa cttegcgcgc tacaggagca gggtaagtt cagcaggagc gcccacgccc ccgcctacca gcaggccag aaccagctgt ataacgagct gaacctggc aggagggagg agtagcactgt gctggacaag aggagggca gggaccccga gatggcggc aagcccagga ggaagaaccc ccaggaggcgc ctgtataacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct acagcgagat cggcatgaag ggcgagagga ggagggcaa gggccacgac ggcctgtacc aggccttagt gaccgcacc aaggacacct acgacccct gcacatgcag gccctgccc ccaggtccgg agagggcaga ggaagtcttc taacatgcgg tgacgtggag gagaatcccg gccttagggt gagcaaggc gaggagctgt tcaccgggt ggtgccatc ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacgca cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgcag ggcgtatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgcctggc ccaccctgt gaccaccctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgtac cccgaccaca tgaaggcagca cgacttcttc aagtcggca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgcga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtaa cgcacatcgag ctgaaggcga tcgacttcaa ggaggacggc aacatctgg ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga	1740 1800 1860 1920 1980 2040 2100 2160 2220 2280 2340 2400 2460 2520 2580 2640 2700 2760 2820 2880 2940 3000 3060 3120 3180
	agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc	3240
	tcgcgcacca ctaccagcag aacacccca tggcgacgg ccccggtctg ctgcggcaca	3300
	accactacct gaggcaccagg tccgcctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca	3360
	tggctctgtt ggagttcggt accgcgcgcgg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca	3420
	agtga	3425
	<210> 53	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 抗 AAA CDR H1 Kabat	
	<400> 53	
	Ser Tyr Gly Met Ser	
	1 5	
	<210> 54	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 抗 AAA CDR H2 Kabat
<400> 54
Ser Ser Gly Gly Ser Tyr
1 5
<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗 AAA CDR H3 Kabat
<400> 55
Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 56
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗 AAA CDR L1 Kabat
<400> 56
Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15
[0032] <210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗 AAA CDR L2 Kabat
<400> 57
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗 AAA CDR L3 Kabat
<400> 58
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5
<210> 59
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 抗 AAA-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物

<400> 59

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

[0033]

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 165 170 175
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 180 185 190
 Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 195 200 205
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 210 215 220
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 225 230 235 240
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 245 250 255
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
 275 280 285
 Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 290 295 300
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 305 310 315 320
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 325 330 335

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 340 345 350
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 355 360 365
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 370 375 380
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 385 390 395 400
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 405 410 415
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 420 425 430
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 435 440 445
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455
 <210> 60
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 AAA-scFv
 <400> 60

[0034]

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 180 185 190
 Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 195 200 205
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 210 215 220
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 225 230 235 240
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 245 250 255
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 260 265 270
 <210> 61
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 AAA VH
 <400> 61
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 [0035] 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 <210> 62
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 AAA VL
 <400> 62

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

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

<210> 63
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 AAA-Fab-重链-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD 融合物
 <400> 63

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 [0036] 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 245 250 255
 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 260 265 270
 Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 275 280 285
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 290 295 300
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 325 330 335
 Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 340 345 350
 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 355 360 365
[0037] Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 370 375 380
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 385 390 395 400
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 405 410 415
 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 420 425
 <210> 64
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 AAA-Fab 重链
 <400> 64
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 [0038] 225 230 235 240
 Lys Ser Cys

<210> 65
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 AAA-Fab 轻链
 <400> 65

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

	100	105	110
	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
	115	120	125
	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
	130	135	140
	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
	145	150	155
	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
	165	170	175
	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
	180	185	190
	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
	195	200	205
	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215	
	<210> 66		
	<211> 780		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 66		
[0039]	atggcgccgc cgcacatccgtg gtggctgtgc gtgctggca ccctgggtggg cctgagcgcg	60	
	accccggegc cgaaaagctg cccggAACgc cattattggg cgcaggcCAA actgtgtgc	120	
	cagatgtgcg aaccgggcac ctttctggta aaagattgcg atcagcatcg caaagcggcg	180	
	cagtgcgate cgtgcattcc gggcgtgagc tttagccccgg atcatcatac ccggccgcatt	240	
	tgcgaaagct gccgccatgt caacagcggc ctgctggtc gcaactgcac cattaccgcg	300	
	aacgcggaat gcgcgtgcg caacggctgg cagtgcgcg ataaagaatg caccgaatgc	360	
	gatccgcgtgc cgaaccccgag cctgaccgcg cgcacgcgacc aggcgctgag cccgcattccg	420	
	cagccgaccc atctgccgta tgtgagcggaa atgctggaaag cgccgcaccgc gggccatatg	480	
	cagaccctgg cggattttcg ccagctgcgc gcgcgcaccc tgagcaccca ttggccgcgg	540	
	cagcgcagcc tgtgcagcag cgattttatt cgcattctgg tgattttttag cggcatgttt	600	
	ctgggttta ccctggcggg cgcgtgttt ctgcattcgc gcccacaata tcgcagcaac	660	
	aaaggcggaaa gcccgggtgga accggcgaa ccgtgccatt atagctgccc gcgcgaagaa	720	
	gaaggcagca ccattccgat tcaggaagat tatgccaaacc cgaaaccggc gtgcagcccg	780	
	<210> 67		
	<211> 260		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 67		
	Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val		
	1	5	10
	Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr		
	20	25	30
	Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe		
	35	40	45
	Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro		

	50	55	60
	Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His		
65	70	75	80
	Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys		
	85	90	95
	Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys		
	100	105	110
	Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu		
	115	120	125
	Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His		
	130	135	140
	Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met		
145	150	155	160
	Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr		
	165	170	175
	His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile		
	180	185	190
	Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala		
	195	200	205
	Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser		
	210	215	220
	Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys His Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu		
[0040]	225	230	235
	Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro		
	245	250	255
	Ala Cys Ser Pro		
	260		
<210>	68		
<211>	750		
<212>	DNA		
<213>	Mus musculus		
<400>	68		
	atggcgtggc cgccgcccata ttggctgtgc atgctggca ccctgggtggg cctgagcg		60
	accctggcgc cgaacagctg cccggataaa cattatggaa ccggcggcgg cctgtgctgc		120
	cgcattgtgcgc aaccgggcac ctttttgcgt aaagattgcg aacaggatcg caccggcg		180
	cagtgcgtatc cgtgcattcc gggcaccagc ttagccccgg attatcatac ccccccgc		240
	tgcgaaagct gcccatttgc caacageggc ttcttgcattt gcaactgcac cgtgaccgc		300
	aacgcggaat gcagctgcgc caaaaactgg cagtgccgcg atcaggaatgc caccgaatgc		360
	gatccggccgc tgaacccggc gtcgaccgc cagccgagcg aaaccccgag cccgcagccg		420
	ccggccgaccc atctggccgc tggcaccgaa aaaccggact ggccgctgc tcgcccgc		480
	ccgaacagca ccgtgtatag ccagcgcgc agccatgcgc cgctgtgcgc cagcgattgc		540
	attcgcattt ttgtgacatt tagcgcattt gtttgcattt ttgtgctggg cgcgatttgc		600
	ttttttcatc agcggccgaa ccatggcccg aacaagatc gccaggcggt gccggaaagaa		660
	ccgtggccgt atagctgccc ggcgaaagaa gaaggcagcg cgattccgat tcaggaagat		720
	tatcgcaaac cggaaccggc gtttatccg		750

<210>	69			
<211>	250			
<212>	PRT			
<213>	Mus musculus			
<400>	69			
Met Ala Trp Pro Pro Pro Tyr Trp Leu Cys Met Leu Gly Thr Leu Val				
1	5	10	15	
Gly Leu Ser Ala Thr Leu Ala Pro Asn Ser Cys Pro Asp Lys His Tyr				
20	25	30		
Trp Thr Gly Gly Gly Leu Cys Cys Arg Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe				
35	40	45		
Phe Val Lys Asp Cys Glu Gln Asp Arg Thr Ala Ala Gln Cys Asp Pro				
50	55	60		
Cys Ile Pro Gly Thr Ser Phe Ser Pro Asp Tyr His Thr Arg Pro His				
65	70	75	80	
Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Phe Leu Ile Arg Asn Cys				
85	90	95		
Thr Val Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ser Cys Ser Lys Asn Trp Gln Cys				
100	105	110		
Arg Asp Gln Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Ala Leu				
115	120	125		
[0041] Thr Arg Gln Pro Ser Glu Thr Pro Ser Pro Gln Pro Pro Pro Thr His				
130	135	140		
Leu Pro His Gly Thr Glu Lys Pro Ser Trp Pro Leu His Arg Gln Leu				
145	150	155	160	
Pro Asn Ser Thr Val Tyr Ser Gln Arg Ser Ser His Arg Pro Leu Cys				
165	170	175		
Ser Ser Asp Cys Ile Arg Ile Phe Val Thr Phe Ser Ser Met Phe Leu				
180	185	190		
Ile Phe Val Leu Gly Ala Ile Leu Phe Phe His Gln Arg Arg Asn His				
195	200	205		
Gly Pro Asn Glu Asp Arg Gln Ala Val Pro Glu Glu Pro Cys Pro Tyr				
210	215	220		
Ser Cys Pro Arg Glu Glu Gly Ser Ala Ile Pro Ile Gln Glu Asp				
225	230	235	240	
Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Phe Tyr Pro				
245	250			
<210> 70				
<211> 660				
<212> DNA				
<213> Homo sapiens				
<400> 70				
atgctgcgcc tgctgctggc gctgaacctg tttccgagca ttcaggtgac cggcaacaaa				60
attctggta aacagagccc gatgctggtg gcgtatgata acgcgggtgaa cctgagctgc				120

aataatagct ataacctgtt tagccgcgaa tttcgccgca gcctgcataa aggcctggat
 agcgcgggtgg aagtgtgcgt ggtgttatggc aactatagcc agcagctgca ggtgtatagc
 aaaaccggct ttaactgcga tggcaaactg ggcaacgaaa gctgtacctt ttatctgcag
 aacctgtatg tgaaccagac cgatatttat tttgcaaaa ttgaagtgtat gtatccgccc
 ccgtatctgg ataacgaaaa aagcaacggc accattattc atgtgaaagg caaacatctg
 tgcccgagcc cgctgttcc gggcccgagc aaaccgttt ggggtctgg ggtggggc
 ggcgtgctgg cgtctatag cctgctggtg accgtggcgt ttattatTT ttgggtgcgc
 agcaaacgca gccgcctgct gcatagcgat tatatgaaca tgacccgcg cccggggc
 ccgaccgcgca aacattatca gccgtatgcg ccgccgcgcg atttgcggc gtatcgac
 <210> 71
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
 1 5 10 15
 Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
 20 25 30
 Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
 35 40 45
 Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
 50 55 60
 [0042] Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
 65 70 75 80
 Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
 85 90 95
 Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
 115 120 125
 Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
 130 135 140
 Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 145 150 155 160
 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 165 170 175
 Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 180 185 190
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 195 200 205
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 210 215 220
 <210> 72
 <211> 654
 <212> DNA

<213>	Mus musculus															
<400>	72															
atgaccctgc	gcctgctgtt	tctggcgctg	aactttta	gcgtgcaggt												
aaaattctgg	tcaaacagag	cccgctgctg	gtggtgata	gcaacgaagt												
tgccgctata	gctataacct	gctggcggaa	gaatttcgctg	cgagcctgttaaaaggcg												
aacagcgatg	tggaagtgtg	cgtggcaac	ggcaacttta	cctatcagcc												
agcaacgcgg	aatttaactg	cgatggcgat	tttgataacg	aaaccgtgac												
tggaacctgc	atgtgaacca	taccgatatt	tatTTTgca	aaattgaatt												
ccggcgatc	tggataacga	acgcagcaac	ggcaccatta	ttcatattaa												
ctgtgccata	cccagagcag	cccgaaactg	ttttggcgc	tggtgggtgg												
ctgtttgtc	atggcctgtc	ggtgaccgtg	gcgcgtgtcg	ggcggcg												
cgcaaccgcc	tgctgcagag	cgattatatg	aacatgaccc	cgccgcgc												
cgcggcc	atcagccgt	tgcgcggcg	cgcgatttg	cgcgatc												
cgcggcc	tgccgtatcg	cccc														
<210>	73															
<211>	218															
<212>	PRT															
<213>	Mus musculus															
<400>	73															
Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Leu	Phe	Leu	Ala	Leu	Asn	Phe	Phe	Ser	Val	Gln	
1																
10																
15																
Val	Thr	Glu	Asn	Lys	Ile	Leu	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Leu	Leu	Val	Val	
20																
25																
30																
[0043]	Asp	Ser	Asn	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu
35																
40																
45																
Ala	Lys	Glu	Phe	Arg	Ala	Ser	Leu	Tyr	Lys	Gly	Val	Asn	Ser	Asp	Val	
50																
55																
60																
Glu	Val	Cys	Val	Gly	Asn	Gly	Asn	Phe	Thr	Tyr	Gln	Pro	Gln	Phe	Arg	
65																
70																
75																
80																
Ser	Asn	Ala	Glu	Phe	Asn	Cys	Asp	Gly	Asp	Phe	Asp	Asn	Glu	Thr	Val	
85																
90																
95																
Thr	Phe	Arg	Leu	Trp	Asn	Leu	His	Val	Asn	His	Thr	Asp	Ile	Tyr	Phe	
100																
105																
110																
Cys	Lys	Ile	Glu	Phe	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Arg	
115																
120																
125																
Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Ile	Lys	Glu	Lys	His	Leu	Cys	His	Thr	
130																
135																
140																
Gln	Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Phe	Trp	Ala	Leu	Val	Val	Val	Ala	Gly	Val	
145																
150																
155																
160																
Leu	Phe	Cys	Tyr	Gly	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Leu	Cys	Val	Ile	Trp	
165																
170																
175																
Thr	Asn	Ser	Arg	Arg	Asn	Arg	Leu	Leu	Gln	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	
180																
185																
190																
Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Leu	Thr	Arg	Lys	Pro	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	
195																
200																
205																
Pro	Ala	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Pro							

	210	215	
<210>	74		
<211>	768		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	74		
	atggaaaca gctgttacaa catagtagcc actctgtgc tggcctcaa ctttgagg	60	
	acaagatcat tgcaggatcc ttgttagtaac tgcccagtc gtacattctg tgataataac	120	
	aggaatcaga tttgcagtcc ctgtcccca aatagttct ccagcgcagg tggacaaagg	180	
	acctgtgaca tatgcaggca gtgtaaaggt gtttcagga ccaggaagga gtgttcctcc	240	
	accagcaatg cagagtgtga ctgcactcca gggttcaact gcctggggc aggatgcagc	300	
	atgtgtgaac aggattgtaa acaaggtaa gaactgacaa aaaaaggtt gaaagactgt	360	
	tgctttggaa catttaacga tcagaaacgt ggcacatgtc gaccctggac aaactgttct	420	
	ttggatggaa agtctgtgct tgtgaatggg acgaaggaga gggacgtgg ctgtggacca	480	
	tctccagccg acctctctcc gggagcatcc tctgtgaccc cgccctcccc tgcgagagag	540	
	ccaggacact ctccgcagat catctccctc ttcttcgcgc tgacgtcgac tgcgttgctc	600	
	ttcctgtgt tcttcctcac gctccgttc tctgtgtta aacggggcag aaagaaactc	660	
	ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc	720	
	tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgtga	768	
<210>	75		
<211>	255		
<212>	PRT		
[0044]	<213> Homo sapiens		
<400>	75		
	Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu		
1	5	10	15
Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro			
20	25	30	
Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys			
35	40	45	
Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile			
50	55	60	
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser			
65	70	75	80
Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly			
85	90	95	
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu			
100	105	110	
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln			
115	120	125	
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys			
130	135	140	
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro			
145	150	155	160
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala			

	165	170	175
Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu			
180	185	190	
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu			
195	200	205	
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
210	215	220	
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
225	230	235	240
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
245	250	255	
<210> 76			
<211> 768			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 76			
atggcaaca actgctataa cgtgggtgtt atttgtctgc tgctgggtgg ctgcgaaaaaa			60
gtggcgccgg tgcagaacag ctgcgataac tgccagccgg gcacctttt ccgcaaatat			120
aacccgggtgt gcaaaagctg cccggccggc accttttagca gcattggcgg ccagccgaac			180
tgcacacattt gcccgtgtg cgccggctat ttgcgttta aaaaattttt cagcagcacc			240
cataacgcgg aatgcgaatg cattgaaggc ttcatgtcc tggccgcga gtgcacccgc			300
tgcggaaaag attgccgccc gggccaggaa ctgaccaaac agggctgcaa aacctgcagc			360
[0045] ctgggcacct ttaacgatca gaacggcacc ggcgtgtgcc gcccgtggac caactgcagc			420
ctggatggcc gcagcgtgt gaaaaccggc accaccgaaa aagatgtggt gtgcggccgc			480
ccgggtgtga gcttttagccc gagcaccacc attagcgtga ccccggaagg cggccccggc			540
ggccatagcc tgcaggtgt gaccctgtt ctggcgtga ccagcgcgt gctgtggcg			600
ctgatTTTta ttaccctgt gttagcgtg ctgaaatggta ttgcaaaaaaaa atttccgcat			660
atTTTaaac agccgtttaa aaaaaccacc ggccggcgc aggaagaaga tgcgtgcagc			720
tggcgtgcc cgcaggaaga agaaggcggc ggccggcgt atgaactg			768
<210> 77			
<211> 256			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 77			
Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val			
1	5	10	15
Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln			
20	25	30	
Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro			
35	40	45	
Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys			
50	55	60	
Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr			
65	70	75	80
His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro			

	85	90	95
Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr			
100	105	110	
Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn			
115	120	125	
Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg			
130	135	140	
Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro			
145	150	155	160
Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu			
165	170	175	
Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala			
180	185	190	
Leu Thr Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe			
195	200	205	
Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln			
210	215	220	
Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser			
225	230	235	240
Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu			
245	250	255	
<210> 78			
[0046] <211> 831			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 78			
atgtgcgtgg gcgcgcgcgc cctggccgc ggcccgtgcg cggcgctgct gctgctggc		60	
ctggcctga gcaccgtgac cggcctgcat tgcgtggcg atacctatcc gageaacat		120	
cgcgtgtgcc atgaatgcgc cccggcaac ggcattgtga gcccgtgcag ccgcaggcag		180	
aacaccgtgt gcccggcgtg cggccggc ttataacg atgtggtag cagcaaaccg		240	
tgc当地 accgtgtgc acacccgtgc agccgcagcg aacgc当地 aactgtgc当地		300	
gcaaccagg ataccgtgtc cgc当地 cgc当地 gccc当地 cacc当地 tagtataaa		360	
ccggcgtgg attgc当地 cgtccgc当地 ggc当地 tta gccc当地 cgc当地		420	
tgc当地 accgtggc当地 ggc当地 acata ggc当地 cgc当地 ggcc当地		480	
acc当地 cgc当地 taccgtgc当地 cgc当地 ggcc当地 cacc当地 gagcc		540	
ggccggc当地 cgc当地 cgc当地 taccgtgc当地 cgc当地 cacc当地 gagcc		600	
ccggc当地 gagca cccggc当地 ggaatgc当地 ggc当地 cggc当地 cggc当地		660	
ctggcctgg tgc当地 gctggcc当地 ctggc当地 tgc当地 gctggcc当地 gtatctggc		720	
cgc当地 cgc当地 agcgc当地 gccggatgc当地 cataaaccgc cggc当地 cggc当地		780	
acccgattc aggaagaaca ggc当地 gatgc当地 catagcaccc tggc当地 aaaaat t		831	
<210> 79			
<211> 277			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 79			

	Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu	
1	5	10 15
	Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val	
	20 25 30	
	Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro	
	35 40 45	
	Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys	
	50 55 60	
	Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro	
65	70 75 80	
	Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys	
	85 90 95	
	Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly	
	100 105 110	
	Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys	
	115 120 125	
	Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp	
	130 135 140	
	Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn	
145	150 155 160	
	Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro	
	165 170 175	
[0047]	Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr	
	180 185 190	
	Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu	
	195 200 205	
	Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val	
	210 215 220	
	Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu	
225	230 235 240	
	Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly	
	245 250 255	
	Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Gln Ala Asp Ala His Ser	
	260 265 270	
	Thr Leu Ala Lys Ile	
	275	
<210>	80	
<211>	816	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	80	
	atgtatgtgt ggggcagca gccgaccgcg ctgctgctgc tggcgctgac cctggccgtg	60
	accgcgcgcc gcctgaactg cgtgaaacat acctatccga gcggccataaa atgctggcgc	120
	gaatgccage cggccatgg catggtagc cgctgcgate atacccgcga taccctgtgc	180
	catccgtgcg aaaccggctt ttataacgaa gcggtgaact atgatacctg caaacagtgc	240

acccagtgea accatgcagc cggcagcgaa ctgaaacaga actgcacccc gaccaggat		300
accgtgtgcc gctgccgccc gggcacccag ccgcgccagg atagcggtca taaactggc		360
gtggattgctg tgccgtgcc cccggccat tttagccccg gcaacaacca ggcgtcaaa		420
ccgtggacca actgcacccct gagcggcaaa cagacccggc atccggcag cgatagccg		480
gatgcggtgt gcgaagatcg cagcctgctg gcgaccctgc tgtggaaac ccagcggccg		540
accttcgccc cgaccaccgt gcagagcacc accgtgtggc cgccgaccag cgaactgccc		600
agcccgccga ccctgggtgac cccggaaaggc ccggcgtttgc gggtgtcgct gggcctggc		660
ctgggcctgc tggcgcgcct gaccgtgtcg ctggcgctgt atctgctcgcaaaagcgtgg		720
cgcctggcga acaccccgaa accgtgtgg ggcaacagct ttgcaccc gattcaggaa		780
gaacataccg atgcgcattt taccctggcg aaaatt		816
<210> 81		
<211> 272		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 81		
Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu		
1 5 10 15		
Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr		
20 25 30		
Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met		
35 40 45		
Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu		
[0048] 50 55 60		
Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys		
65 70 75 80		
Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr		
85 90 95		
Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg		
100 105 110		
Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro		
115 120 125		
Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn		
130 135 140		
Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu		
145 150 155 160		
Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu		
165 170 175		
Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Val Gln Ser Thr Thr Val		
180 185 190		
Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro		
195 200 205		
Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu		
210 215 220		
Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp		
225 230 235 240		

Arg	Leu	Pro	Asn	Thr	Pro	Lys	Pro	Cys	Trp	Gly	Asn	Ser	Phe	Arg	Thr
				245				250						255	
Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	His	Thr	Asp	Ala	His	Phe	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile
					260			265						270	
<210>	82														
<211>	597														
<212>	DNA														
<213>	Homo sapiens														
<400>	82														
atgaaaagcg	gcctgtggta	ttttttctg	tttgcctgc	gcattaaagt	gctgaccggc									60	
gaaattaacg	gcagcgcgaa	ctatgaaatg	tttatttttc	ataacggcgg	cgtgcagatt									120	
ctgtgcaaat	atccggatat	tgtcagcag	tttaaaatgc	agctgctgaa	aggcgcccag									180	
attctgtgcg	atctgaccaa	aaccaaaggc	agcggcaaca	ccgtgagcat	taaaaggctg									240	
aaattttgcc	atagccagct	gagcaacaac	agcgtgagct	tttttctgta	taacctggat									300	
catagccatg	cgaactattt	ttttgcaac	ctgagcattt	ttgatccgcc	gccgtttaaa									360	
gtgaccctga	ccggcggcta	tctgcataatt	tatgaaagcc	agctgtgctg	ccagctgaaa									420	
ttttggctgc	cgattggctg	cgcggcggtt	gtgggtgtgt	gcattctggg	ctgcattctg									480	
atttgctgge	tgacaaaaaa	aaaatatagc	agcagcgtgc	atgatccgaa	cggcgaatat									540	
atgttatgc	gcgcggtaa	caccgcgaaa	aaaagccgccc	tgaccgatgt	gaccctg									597	
<210>	83														
<211>	199														
<212>	PRT														
[0049]	<213>	Homo sapiens													
<400>	83														
Met	Lys	Ser	Gly	Leu	Trp	Tyr	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Leu	Arg	Ile	Lys
1				5				10						15	
Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Ile	Asn	Gly	Ser	Ala	Asn	Tyr	Glu	Met	Phe	Ile
					20			25						30	
Phe	His	Asn	Gly	Gly	Val	Gln	Ile	Leu	Cys	Lys	Tyr	Pro	Asp	Ile	Val
					35			40						45	
Gln	Gln	Phe	Lys	Met	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Gly	Gln	Ile	Leu	Cys	Asp
					50			55						60	
Leu	Thr	Lys	Thr	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Val	Ser	Ile	Lys	Ser	Leu
					65			70						80	
Lys	Phe	Cys	His	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	Leu
					85			90						95	
Tyr	Asn	Leu	Asp	His	Ser	His	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Asn	Leu	Ser
					100			105						110	
Ile	Phe	Asp	Pro	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Leu
					115			120						125	
His	Ile	Tyr	Glu	Ser	Gln	Leu	Cys	Cys	Gln	Leu	Lys	Phe	Trp	Leu	Pro
					130			135						140	
Ile	Gly	Cys	Ala	Ala	Phe	Val	Val	Val	Cys	Ile	Leu	Gly	Cys	Ile	Leu
					145			150						155	
Ile	Cys	Trp	Leu	Thr	Lys	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	His	Asp	Pro

	165	170	175
Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser			
180	185	190	
Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu			
195			
<210> 84			
<211> 600			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 84			
atgaaaccgt attttgccg cgtgttgc tttgttttc tgattcgct gctgaccggc	60		
gaaaattaacg gcagcgcgga tcatcgcatg tttagcttc ataacggcgg cgtgcagatt	120		
agctgcaaat atccggaaac cgtgcagcag ctgaaaatgc gcctgtttcg cgaacgcgaa	180		
gtgctgtgcg aactgaccaa accaaaggc agcggcaacg cggtgagcat taaaaacccg	240		
atgctgtgcc tgtatcatct gagcaacaac agcgtgagct ttttctgaa caacccggat	300		
agcagccagg gcagctattt ttttgcgc ctgagcattt ttgatccgccc gccgtttcag	360		
gaacgcaccc tgagcggcgg ctatctgcat atttatgaaa gccagctgtg ctgccagctg	420		
aaactgtgge tgccgggtgg ctgcgcggcg tttgtggtgg tgctgctgtt tggctgcatt	480		
ctgattattt ggtagccaa aaaaaaatat ggcagcagcgc tgcatgatcc gaacagcga	540		
tatatgtta tggcggcggt gaacaccaac aaaaaaaagcc gcctggcggg cgtgaccagc	600		
<210> 85			
<211> 200			
[0050] <212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 85			
Met Lys Pro Tyr Phe Cys Arg Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Arg			
1 5 10 15			
Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser			
20 25 30			
Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val			
35 40 45			
Gln Gln Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu			
50 55 60			
Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro			
65 70 75 80			
Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu			
85 90 95			
Asn Asn Pro Asp Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser			
100 105 110			
Ile Phe Asp Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr			
115 120 125			
Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu			
130 135 140			
Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile			

145	150	155	160
Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr Gly Ser Ser Val His Asp			
165	170	175	
Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys			
180	185	190	
Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser			
195	200		
<210> 86			
<211> 279			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 86			
atgattcatc tggccatat tctgtttctg ctgctgctgc cggtggcgcc ggccgcagacc		60	
accccgggcg aacgcagcag cctgccggcg ttttatccgg gcaccagcgg cagctgcagc		120	
ggctgcggca gcctgagcct gccgctgctg gcgggcctgg tggcggcgga tgcggtgtggcg		180	
agcctgctga ttgtggcgcc ggtgtttctg tgcgcgcgc cgcgcgcag cccggcgcag		240	
gaagatggca aagtgtatat taacatgccg ggccgcggc		279	
<210> 87			
<211> 93			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 87			
[0051] Met Ile His Leu Gly His Ile Leu Phe Leu Leu Leu Pro Val Ala			
1 5 10 15			
Ala Ala Gln Thr Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Leu Pro Ala Phe Tyr			
20 25 30			
Pro Gly Thr Ser Gly Ser Cys Ser Gly Cys Gly Ser Leu Ser Leu Pro			
35 40 45			
Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala Val Ala Ser Leu Leu Ile			
50 55 60			
Val Gly Ala Val Phe Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln			
65 70 75 80			
Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly			
85 90			
<210> 88			
<211> 237			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 88			
atggatccgc cgggctatct gctgtttctg ctgctgctgc cggtggcgcc gagccagacc		60	
agcgcggca gctgcagcgg ctgcggcacc ctgaggcctgc cgctgctgg gggcctggtg		120	
gccccggatg cggtgatgag cctgctgatt gtggcgtgg tgtttgatgt catgcgcggc		180	
catggccgcc cggcgcagga agatggccgc gtgtatatta acatgccggg ccgcggc		237	
<210> 89			
<211> 79			

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 89
 Met Asp Pro Pro Gly Tyr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Pro Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Gln Thr Ser Ala Gly Ser Cys Ser Gly Cys Gly Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Pro Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala Val Met Ser Leu
 35 40 45
 Leu Ile Val Gly Val Val Phe Val Cys Met Arg Pro His Gly Arg Pro
 50 55 60
 Ala Gln Glu Asp Gly Arg Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly
 65 70 75
 <210> 90
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 atggggggac ttgaaccctg cagcaggctc ctgctccctgc ctctcctgct ggctgtaaat 60
 ggtctccgtc ctgtccaggc ccagggcccg agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120
 ggcgtgctgg cagggatcgat gatgggagac ctgggtctga cagtgtcat tgcctggcc 180
 gtgtacttcc tggcccgct ggtccctcg gggcgagggg ctgcggagac agcgaccgg 240
 aaacagcgta tcactgagac cgagtcgcct tatcaggagc tccagggtaa gaggtcgat 300
 gtctacagcg acctaacaac acagaggccg tattacaaat ga 342
 [0052] <210> 91
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 91
 Met Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
 20 25 30
 Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
 35 40 45
 Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
 50 55 60
 Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 65 70 75 80
 Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
 85 90 95
 Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
 100 105 110
 Lys

<210>	92			
<211>	345			
<212>	DNA			
<213>	Mus musculus			
<400>	92			
	atggggcgtc tggagccctc ctgggcctt ctgttccttc ctgttcctcactgtggga	60		
	ggattaaatgc ccgtacaggc ccagagtgc actttcccaa gatgcgactg ttcttcgtg	120		
	agccctggta tactggctgg gattgttctg ggtgacttgg ttttgactct gctgattgcc	180		
	ctggctgtgt actctctggc ccgcctggc tcccgaggc aaggcacgc ggaagggacc	240		
	cggaaacaac acattgctga gactgagtcg ccttatcagg agttcaggc tcagagacca	300		
	gaagtataca gtgacctaaca cacacagagg caatattaca gatga	345		
<210>	93			
<211>	114			
<212>	PRT			
<213>	Mus musculus			
<400>	93			
	Met Gly Ala Leu Glu Pro Ser Trp Cys Leu Leu Phe Leu Pro Val Leu			
1	5	10	15	
Leu Thr Val Gly Gly Leu Ser Pro Val Gln Ala Gln Ser Asp Thr Phe				
20	25	30		
Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile				
35	40	45		
[0053] Val Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Leu Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr				
50	55	60		
Ser Leu Gly Arg Leu Val Ser Arg Gly Gln Gly Thr Ala Glu Gly Thr				
65	70	75	80	
Arg Lys Gln His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln				
85	90	95		
Gly Gln Arg Pro Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Gln Tyr				
100	105	110		
Tyr Arg				
<210>	94			
<211>	164			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	94			
	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu			
1	5	10	15	
Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys				
20	25	30		
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala				
35	40	45		
Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr				
50	55	60		

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg			
65	70	75	80
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met			
85	90	95	
Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn			
100	105	110	
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met			
115	120	125	
Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly			
130	135	140	
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala			
145	150	155	160
Leu Pro Pro Arg			
<210> 95			
<211> 492			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 95			
atgaagtgga aggcgcttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag	60		
gcacagagct ttggcctgtt ggatccaaa ctctgttacc tgctggatgg aatccttc	120		
atctatggtg tcattctcac tgccttgttc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagag	180		
ccccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agtcaatct aggacgaaga	240		
gaggagtacg atgttttggaa caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	300		
agaaggaaga accctcagga aggctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	360		
gcctacagtg agattggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaagggca cgtatggcctt	420		
taccagggtc tcagtagc acccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg	480		
ccccctcgct aa	492		
<210> 96			
<211> 164			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 96			
Met Lys Trp Lys Val Ser Val Leu Ala Cys Ile Leu His Val Arg Phe			
1	5	10	15
Pro Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys			
20	25	30	
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Ile Thr Ala			
35	40	45	
Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn			
50	55	60	
Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg			
65	70	75	80
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met			
85	90	95	

Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn
 100 105 110
 Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr
 115 120 125
 Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 130 135 140
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Pro Arg

<210> 97
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 97

[0055] atgaagtggaaagtgtctgttctgcgtatccctccacgtcggttcccaggagcagag
 gcacagagcttttgtctgctggatccaaaactgtctacttgcttagatggaaatcccttc
 atctacggatcatcatcacagccctgtacctgagagcaaattcagcaggagtgcagag
 actgtgtccacctgcaggaccccaccagcttacaatagagctcaatctagggcgaaga
 gaggaatatgacgtttggagaagaagcgggtcggtcagagatggaggcaaaacag
 cagaggaggaatggaaacccttccaatggtaataatgcac tgcagaaagaatggca
 gaaggcttacaatgttgcagatcggcacaaaaggcagaggcggagggcaaggggc
 ctaccagggtctcagcacatgccaccaaggacacctatgatgccctgcatatgcagacc
 ctggccctctcgttacaaatgcacatgcacatgcacatgcacatgcacatgcacatgc
 <210> 98
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 98

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

	His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn		
	130	135	140
	Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro		
	145	150	155
	Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe		
	165	170	175
	Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln		
	180	185	190
	Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln		
	195	200	205
	Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly		
	210	215	220
	Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp		
	225	230	235
	Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys		
	245	250	
	<210> 99		
	<211> 762		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 99		
[0056]	atgtggcagc tgctgctgcc gaccgcgtg ctgctgctgg tgagcgccgg catgcgcacc		60
	gaagatctgc cgaaagcggt ggtgttctg gaaccgcagt ggtatcgctg gctggaaaaaa		120
	gatacgctga ccctgaaatg ccagggcgcg tatagcccg aagataacag cacccagtg		180
	tttcataacg aaaggctgtat tagcagccag gcgagcagct attttattga tgcggcacc		240
	gtggatgata gcggcgaata tcgctgccag accaacctga gcaccctgag cgatccggtg		300
	cagctggaaag tgcattttgg ctggctgtc ctgcaggcgc cgcgtgggt gtttaaagaa		360
	gaagatccga ttcatctcgctgctgcatagc tgaaaaaaca ccgcgtgca taaagtgacc		420
	tatctgcaga acggcaaagg ccgcaaataat ttcatcata acagcgattt ttatattccg		480
	aaagcgaccc taaaagatag cggcagctat tttgccgcg gcctgtttgg cagaaaaac		540
	gtgagcagcg aaaccgtgaa cattaccatt acccagggcc tggcggtgag caccattgc		600
	agctttttc cggccggctta tcaggtgac tttgcctgg tgatggct gctgtttcg		660
	gtggataccg gcctgtattt tagcgtaaaa accaacattc gcagcagcac ccgcgattgg		720
	aaagatcata aatttaatg ggcggaaatccgcaggata aa		762
	<210> 100		
	<211> 261		
	<212> PRT		
	<213> Mus musculus		
	<400> 100		
	Met Phe Gln Asn Ala His Ser Gly Ser Gln Trp Leu Leu Pro Pro Leu		
	1	5	10
	Thr Ile Leu Leu Leu Phe Ala Phe Ala Asp Arg Gln Ser Ala Ala Leu		
	20	25	30
	Pro Lys Ala Val Val Lys Leu Asp Pro Pro Trp Ile Gln Val Leu Lys		
	35	40	45

	Glu Asp Met Val Thr Leu Met Cys Glu Gly Thr His Asn Pro Gly Asn	
50	55	60
Ser Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Gly Arg Ser Ile Arg Ser Gln Val		
65	70	75
Gln Ala Ser Tyr Thr Phe Lys Ala Thr Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr		
85	90	95
Arg Cys Gln Met Glu Gln Thr Arg Leu Ser Asp Pro Val Asp Leu Gly		
100	105	110
Val Ile Ser Asp Trp Leu Leu Gln Thr Pro Gln Arg Val Phe Leu		
115	120	125
Glu Gly Glu Thr Ile Thr Leu Arg Cys His Ser Trp Arg Asn Lys Leu		
130	135	140
Leu Asn Arg Ile Ser Phe Phe His Asn Glu Lys Ser Val Arg Tyr His		
145	150	155
His Tyr Lys Ser Asn Phe Ser Ile Pro Lys Ala Asn His Ser His Ser		
165	170	175
Gly Asp Tyr Tyr Cys Lys Gly Ser Leu Gly Ser Thr Gln His Gln Ser		
180	185	190
Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Asp Pro Ala Thr Thr Ser Ser Ile		
195	200	205
Ser Leu Val Trp Tyr His Thr Ala Phe Ser Leu Val Met Cys Leu Leu		
210	215	220
Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Tyr Val Arg Arg Asn Leu Gln		
225	230	235
Thr Pro Arg Glu Tyr Trp Arg Lys Ser Leu Ser Ile Arg Lys His Gln		
245	250	255
Ala Pro Gln Asp Lys		
260		
<210> 101		
<211> 786		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 101		
atgtttcaga atgcacactc tggaaaggca tggctacttc caccactgac aattctgctg	60	
ctgtttgctt ttgcagacag gcagagtgc gctttccga aggctgtggtaaaaactggac	120	
cccccatgga tccaggtgtt caaggaagac atggtgacac tgatgtgcga agggaccac	180	
aaccctggaa actttctac ccagtggttt cacaacggga ggtccatccg gagccaggtc	240	
caagccagtt acacgtttaa ggccacagtc aatgacagtg gagaatatcg gtgtcaaatg	300	
gagcagaccc gcctcagcga ccctgttagat ctgggagtga tttctgactg gctgctgctc	360	
cagacccttc agcgggttt tctggaaaggaa gaaaccatca cgctaagggtt ccatacgctgg	420	
aggaacaaac tactgaacag gatctcattc ttccataatg aaaaatccgt gaggtatcat	480	
cactacaaaa gtaatttctc tatccaaaa gccaaccaca gtcacagtgg ggactactac	540	
tgcaaaggaa gtcttaggaag tacacagcac cagttccaagc ctgtcaccat cactgtccaa	600	
gatccagcaa ctacatcctc catctctta gtctggtaacc acactgcttt ctccctagtg	660	
atgtgcctcc tgtttgcagt ggacacgggc ctttatttct acgtacggag aaatctcaa	720	

accccgaggg	agtactggag	gaagtccctg	tcaatcagaa	agcaccaggc	tcctcaagac	780
aagtga						786
<210>	102					
<211>	216					
<212>	PRT					
<213>	Homo sapiens					
<400>	102					
Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser						
1	5	10		15		
Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr						
20		25		30		
Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu						
35		40		45		
Asn Ala Ser Pro Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly						
50		55		60		
Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Ala Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn						
65		70		75		80
Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys						
85		90		95		
Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln						
100		105		110		
Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met						
[0058]	115	120		125		
Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp						
130		135		140		
Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile						
145		150		155		160
Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro						
165		170		175		
Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr						
180		185		190		
Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr						
195		200		205		
Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val						
210		215				
<210>	103					
<211>	648					
<212>	DNA					
<213>	Homo sapiens					
<400>	103					
atgggctgga ttgcggccg ccgcagccgc catacgctggg aaatgagcga attcataac						60
tataaacctgg atctgaaaaaa aagcgatttt agcacccgct ggcagaaaaca gcgctgcccgt						120
gtgggtaaaaa gcaaatgccg cggaaacgcgc agccctttt tttttgtct ctttattgcgc						180
gtggcgtatgg gcattcgctt tattattatg gtggcgattt ggagcgcgggt gtttctgaac						240
accctgttta accaggaagt gcagattccg ctgaccgaaa gctattgcgg cccgtccccg						300

aaaaactgga	tttgctataa	aaacaactgc	tatcgatttt	tttatgaaaag	caaaaactgg	360
tatgaaaaggcc	aggcgagctg	catgagccag	aacgcgagcc	tgctgaaagt	gtatagcaaa	420
gaagatcagg	atctgctgaa	actggtaaa	agctatcatt	ggatggccct	ggtgcatatt	480
ccgaccaacg	gcagctggca	gtggaaagat	ggcagccatc	tgagccccgaa	cctgctgacc	540
attattgaaa	tgcagaaagg	cgattgcgcg	ctgtatgcga	gcagctttaa	aggctatatt	600
gaaaactgca	gcaccccgaa	cacctatatt	tgcatgcage	gcaccgtg		648
<210>	104					
<211>	232					
<212>	PRT					
<213>	Mus musculus					
<400>	104					
Met Ala Leu Ile Arg Asp Arg Lys Ser His His Ser Glu Met Ser Lys						
1	5	10	15			
Cys His Asn Tyr Asp Leu Lys Pro Ala Lys Trp Asp Thr Ser Gln Glu						
20	25	30				
Gln Gln Lys Gln Arg Leu Ala Leu Thr Thr Ser Gln Pro Gly Glu Asn						
35	40	45				
Gly Ile Ile Arg Gly Arg Tyr Pro Ile Glu Lys Leu Lys Ile Ser Pro						
50	55	60				
Met Phe Val Val Arg Val Leu Ala Ile Ala Leu Ala Ile Arg Phe Thr						
65	70	75	80			
Leu Asn Thr Leu Met Trp Leu Ala Ile Phe Lys Glu Thr Phe Gln Pro						
[0059]	85	90	95			
Val Leu Cys Asn Lys Glu Val Pro Val Ser Ser Arg Glu Gly Tyr Cys						
100	105	110				
Gly Pro Cys Pro Asn Asn Trp Ile Cys His Arg Asn Asn Cys Tyr Gln						
115	120	125				
Phe Phe Asn Glu Glu Lys Thr Trp Asn Gln Ser Gln Ala Ser Cys Leu						
130	135	140				
Ser Gln Asn Ser Ser Leu Leu Lys Ile Tyr Ser Lys Glu Glu Gln Asp						
145	150	155	160			
Phe Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val Gln Ile						
165	170	175				
Pro Ala Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ser Leu Ser Tyr						
180	185	190				
Asn Gln Leu Thr Leu Val Glu Ile Pro Lys Gly Ser Cys Ala Val Tyr						
195	200	205				
Gly Ser Ser Phe Lys Ala Tyr Thr Glu Asp Cys Ala Asn Leu Asn Thr						
210	215	220				
Tyr Ile Cys Met Lys Arg Ala Val						
225	230					
<210>	105					
<211>	696					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					

<400>	105					
atggcgctga	ttcgcgatcg	caaaagccat	catagcgaaa	tgagcaaatg	ccataactat	60
gatctgaaac	cggcgaaatg	ggataccagc	caggaacagc	agaaacagcg	cctggcgctg	120
accaccagcc	agccggcgaa	aaacggcatt	attcgccgc	gctatccgat	tgaaaaactg	180
aaaatttagcc	cgtatgttgt	ggtgcgcgtg	ctggcgattg	cgctggcgat	tcgtttacc	240
ctgaacaccc	tgtatgtggct	ggcgattttt	aaagaaacct	ttcagccggt	gctgtcaac	300
aaagaagtgc	cggtgagcag	ccgcgaaggc	tattgcggcc	cgtccccgaa	caactggatt	360
tgcgcattcgca	acaactgccta	tcagttttt	aacgaagaaa	aaacctggaa	ccagagccag	420
gcgagctgcc	tgagccagaa	cagcagcctg	ctgaaaattt	atagcaaaga	agaacaggat	480
tttctgaaac	tggtgaaaag	ctatcattgg	atggcctgg	tgcagattcc	ggcgaacggc	540
agctggcagt	gggaagatgg	cagcagcctg	agctataacc	agctgaccct	ggtggaaatt	600
ccgaaaggca	gctgcgcgtt	gtatggcagc	agctttaaag	cgtataaccga	agattgcgcg	660
aacctgaaca	cctatatttgc	catgaaacgc	gcggtg			696
<210>	106					
<211>	4					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	CD28 YMNM					
<400>	106					
Tyr Met Asn Met						
1						
[0060]	<210>	107				
	<211>	4				
	<212>	PRT				
	<213>	人工序列				
	<220>					
	<223>	CD28 PYAP				
<400>	107					
Pro Tyr Ala Pro						
1						
<210>	108					
<211>	4					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	CD28 FMNM					
<400>	108					
Phe Met Asn Met						
1						
<210>	109					
<211>	4					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						

<223> CD28 AYAA
 <400> 109
 Ala Tyr Ala Ala
 1
 <210> 110
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 信号肽
 <400> 110
 Ala Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala
 1 5 10 15
 Thr Gly Val His Ser
 20
 <210> 111
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 信号肽 DNA 序列
 <400> 111
[0061] atgggatgga gctgttatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcactcc 57
 <210> 112
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 CD20 (GA101) 重链
 <400> 112
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr 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 Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
195	200	205	
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
210	215	220	
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
245	250	255	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
260	265	270	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
275	280	285	
[0062] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
290	295	300	
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
325	330	335	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
340	345	350	
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
355	360	365	
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
370	375	380	
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
405	410	415	
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
420	425	430	
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
435	440	445	
Lys			

<210> 113

<211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 CD20 (GA101) 轻链
 <400> 113
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
[0063] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 114
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 FAP(4B9) PGLALA 重链
 <400> 114
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
[0064] Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385	390	395	400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
405	410	415	
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
420	425	430	
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	
<210> 115			
<211> 215			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗 FAP(4B9) 轻链			
<400> 115			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1 5 10 15			
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser			
20 25 30			
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35 40 45			
Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50 55 60			
[0065] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
65 70 75 80			
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro			
85 90 95			
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala			
100 105 110			
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser			
115 120 125			
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu			
130 135 140			
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser			
145 150 155 160			
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu			
165 170 175			
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
180 185 190			
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys			
195 200 205			
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210 215			
<210> 116			
<211> 451			
<212> PRT			

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 CEA (A5B7) PGLALA 重链
 <400> 116

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5						10				15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Val	Ser	Ser	Tyr	
				20						25				30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
				35						40				45		
Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Lys	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ala	
				50						55				60		
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	
				65						70				75		80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
					85					90				95		
Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Leu	Arg	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
					100					105				110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
					115					120				125		
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
					130					135				140		
[0066]	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
					145					150				155		160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
					165					170				175		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
					180					185				190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
					195					200				205		
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
					210					215				220		
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
					225					230				235		240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
					245					250				255		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
					260					265				270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
					275					280				285		
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
					290					295				300		
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
					305					310				315		320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	

	325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
340	345	350	
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
355	360	365	
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
370	375	380	
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
405	410	415	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
420	425	430	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
435	440	445	
Pro Gly Lys			
450			
<210> 117			
<211> 223			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
[0067] <220>			
<223> 抗CEA (A5B7) 轻链			
<400> 117			
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala			
20	25	30	
Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr			
35	40	45	
Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val			
50	55	60	
Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile			
65	70	75	80
Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Thr Lys			
100	105	110	
Leu Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
115	120	125	
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu			
130	135	140	
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp			
145	150	155	160

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 165 170 175
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 180 185 190
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 195 200 205
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 118
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗CEA (T84.66LCHA) PGLALA 重链
 <400> 118
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
 [0068] 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 [0069] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 119
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗CEA (T84.66LCHA) 轻链
 <400> 119
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
 20 25 30
 Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 120
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列
[0070]
 <220>
 <223> 抗CEA (CH1A1A98/992F1) PGLALA 重链
 <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 Glu Phe
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
[0071] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 121
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗CEA (CH1A1A98/992F1) 轻链
 <400> 121

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
[0072] Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 122
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 CEA (hMN14) PGLALA 重链
 <400> 122
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
[0073] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		

	435	440	445
Lys			
<210>	123		
<211>	213		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	抗 CEA (hMN14) 轻链		
<400>	123		
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser			
20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser			
85	90	95	
[0074] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro			
100	105	110	
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr			
115	120	125	
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys			
130	135	140	
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
145	150	155	160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser			
165	170	175	
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala			
180	185	190	
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe			
195	200	205	
Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210>	124		
<211>	451		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	抗 TNC (2B10) PGLALA 重链		
<400>	124		

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr 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 Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
[0075] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 125
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗TNC (2B10) 轻链
 <400> 125
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0076] 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 126
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 HER2 (PER) PG LALA 重链 1
 <400> 126
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0077] 85 90 95
 Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
[0078] Lys

<210> 127
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗HER2 (PER) 轻链 1
 <400> 127
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 128

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 HER2 (PER) PG LALA 重链 2

<400> 128

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0079] 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

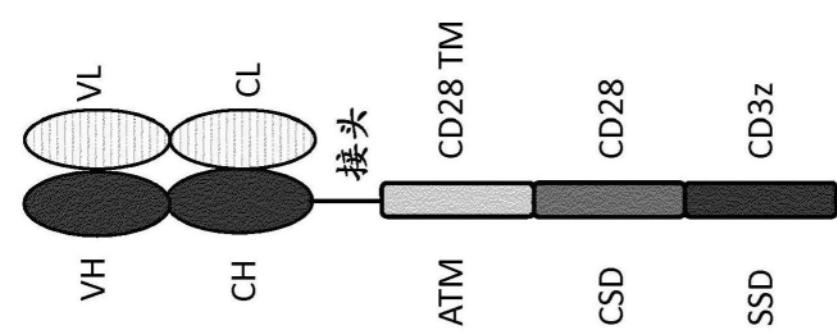
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
[0080] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

 <210> 129
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗 HER2 (PER) 轻链 2
 <400> 129
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
[0081] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 130
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 130
 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 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
 [0082] 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

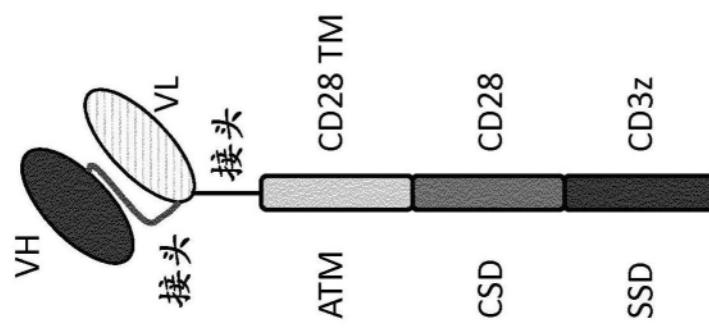
抗体 P329G



Fab 形式

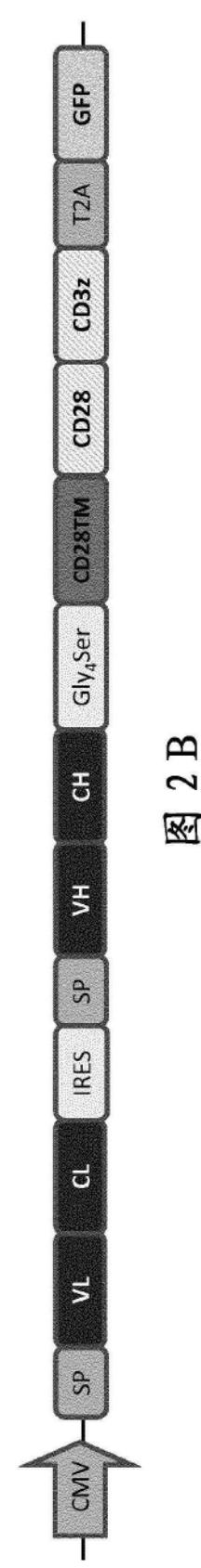
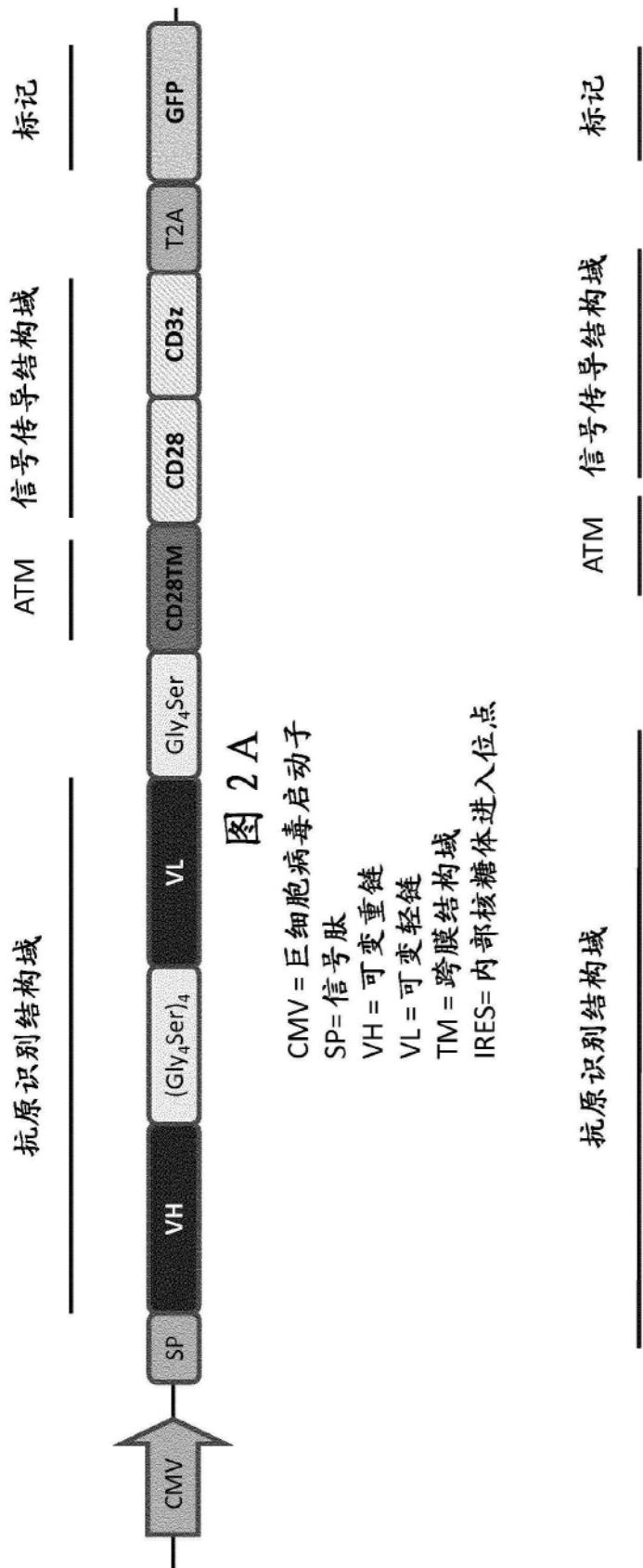
图 1 B

抗体 P329G



scFv 形式

图 1 A



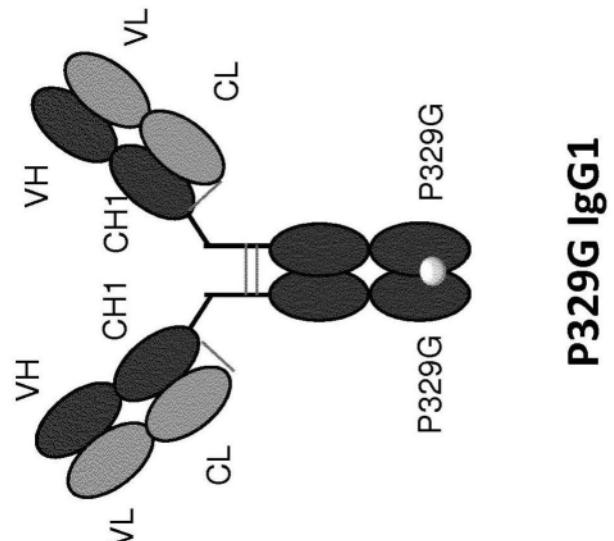


图3

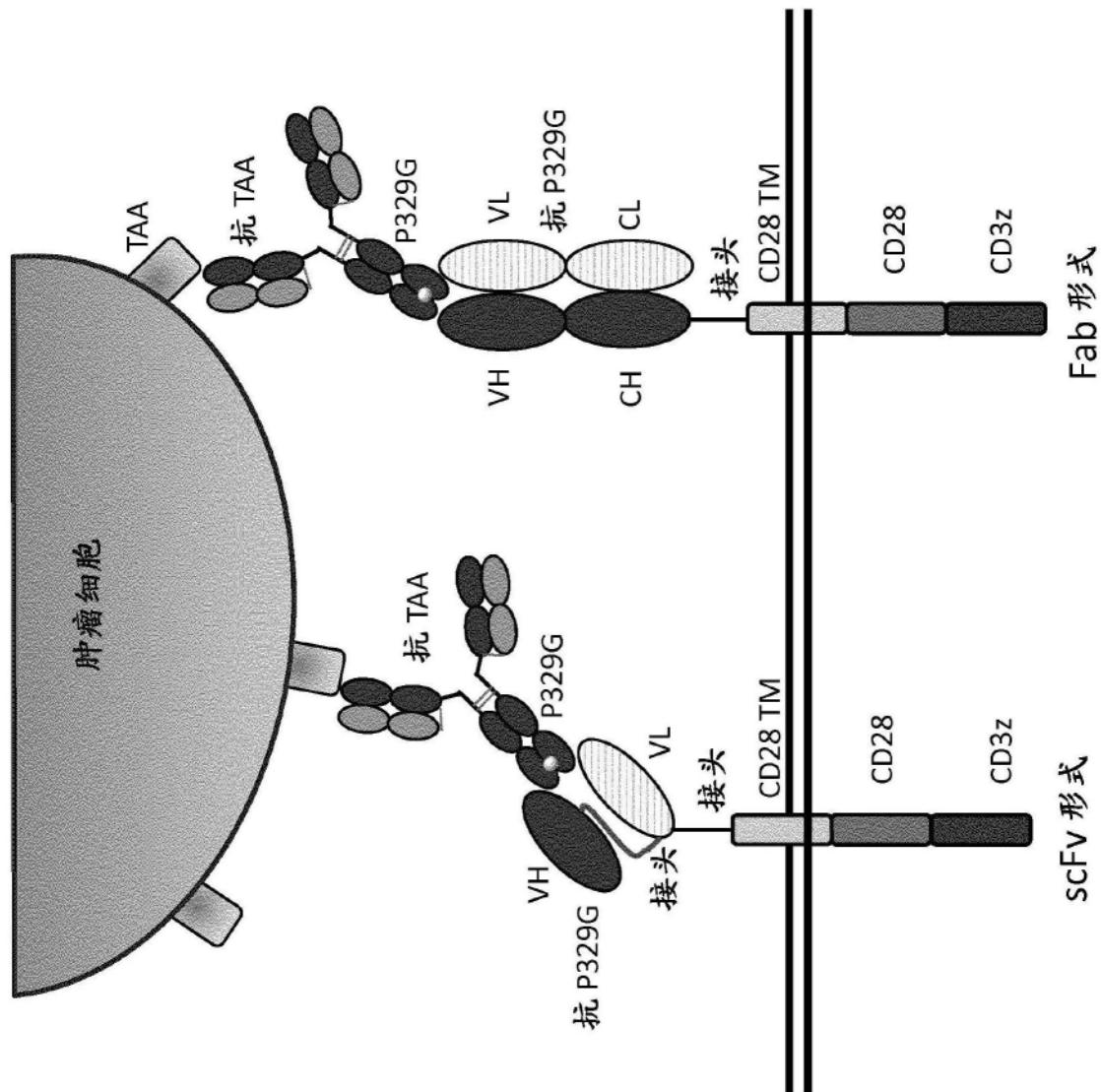


图4

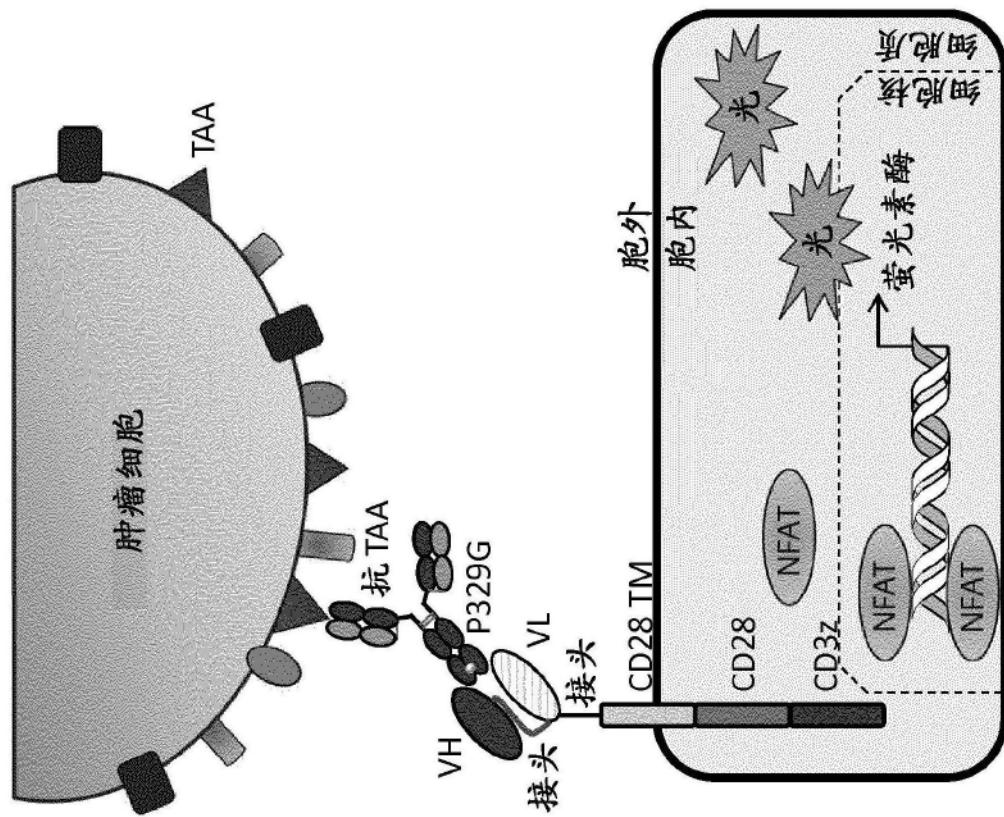


图5

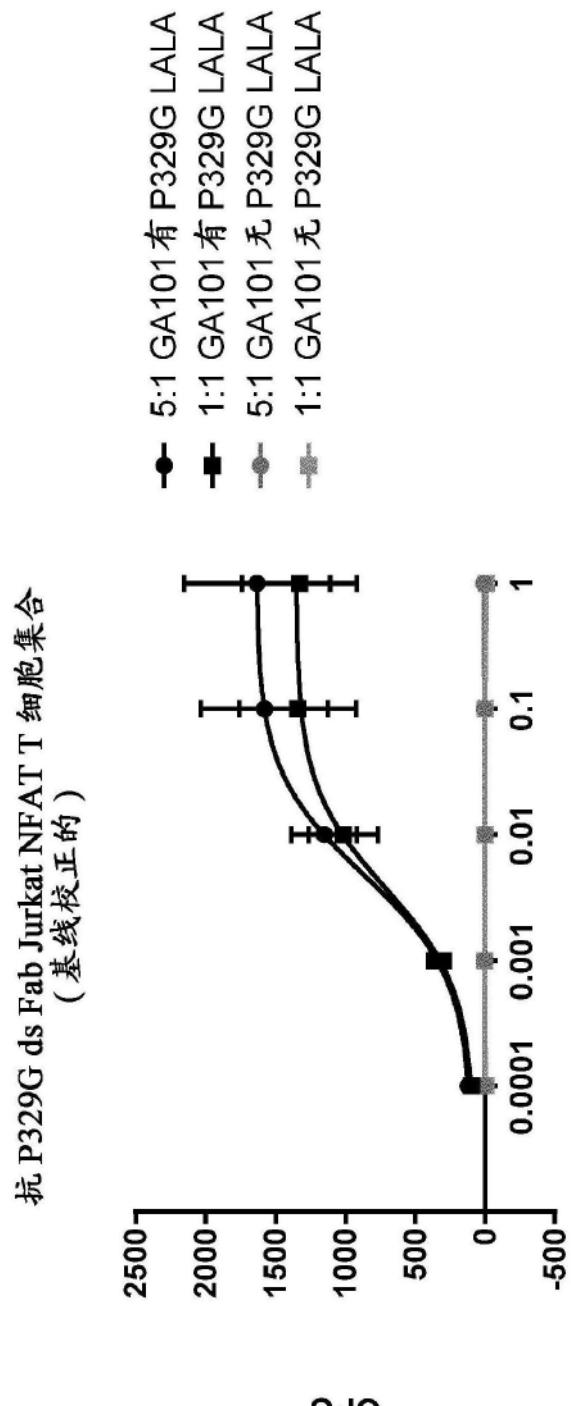


图6A

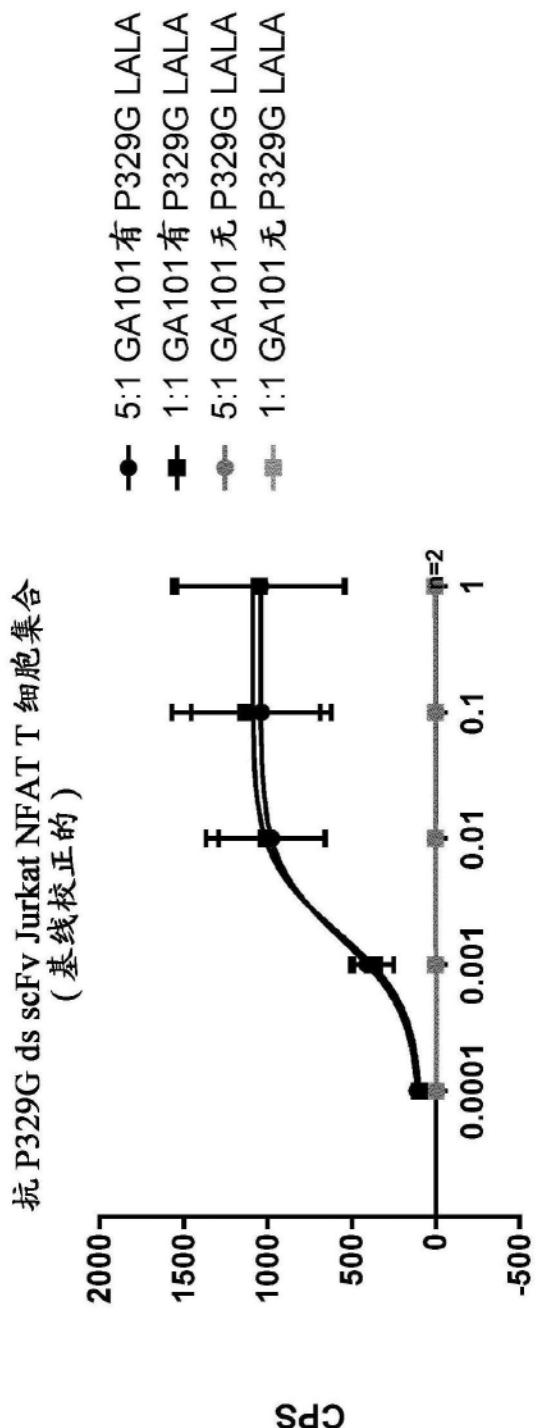


图6B

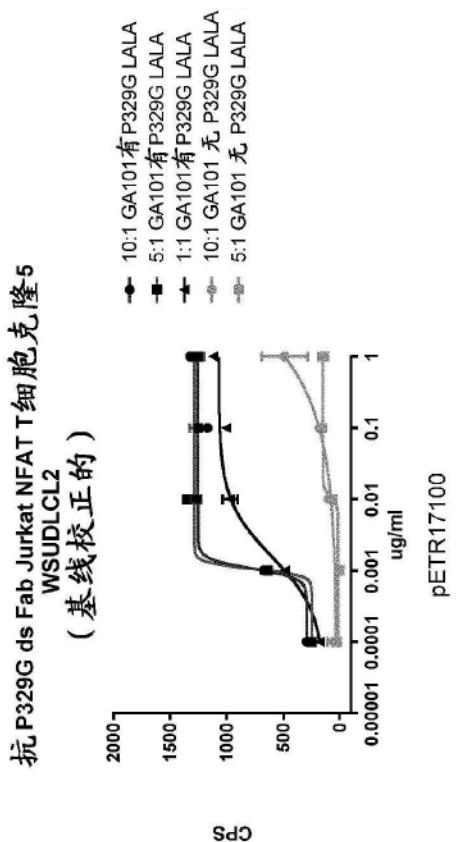


图7A

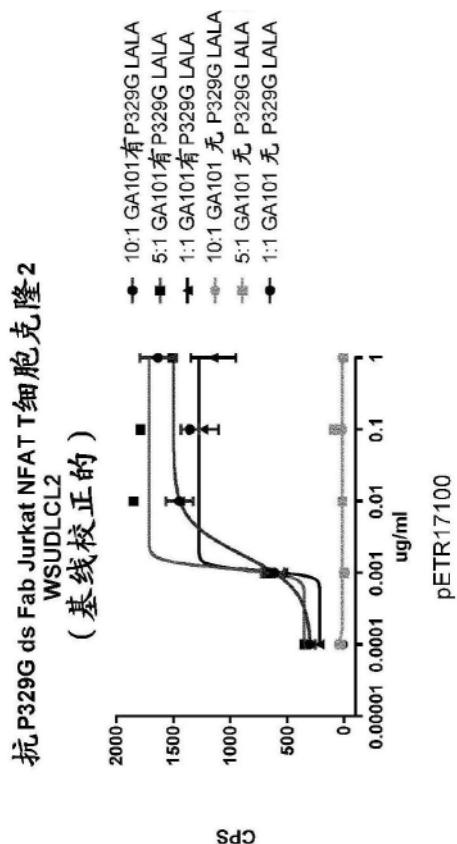


图 7B

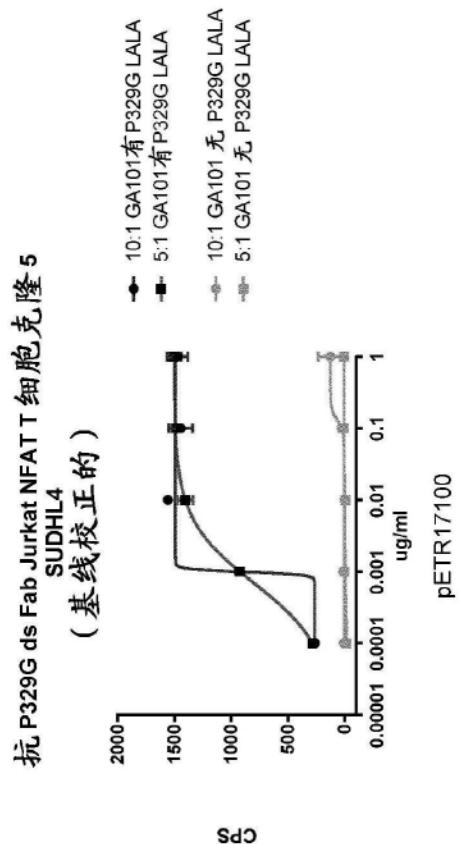


图7C

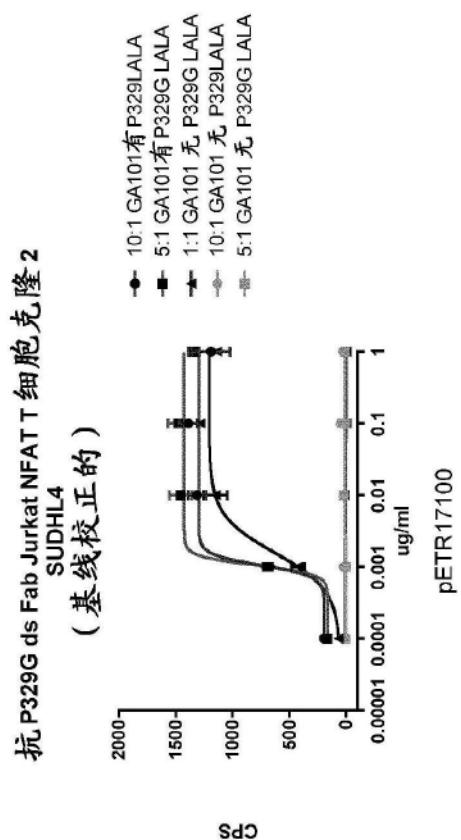


图7D

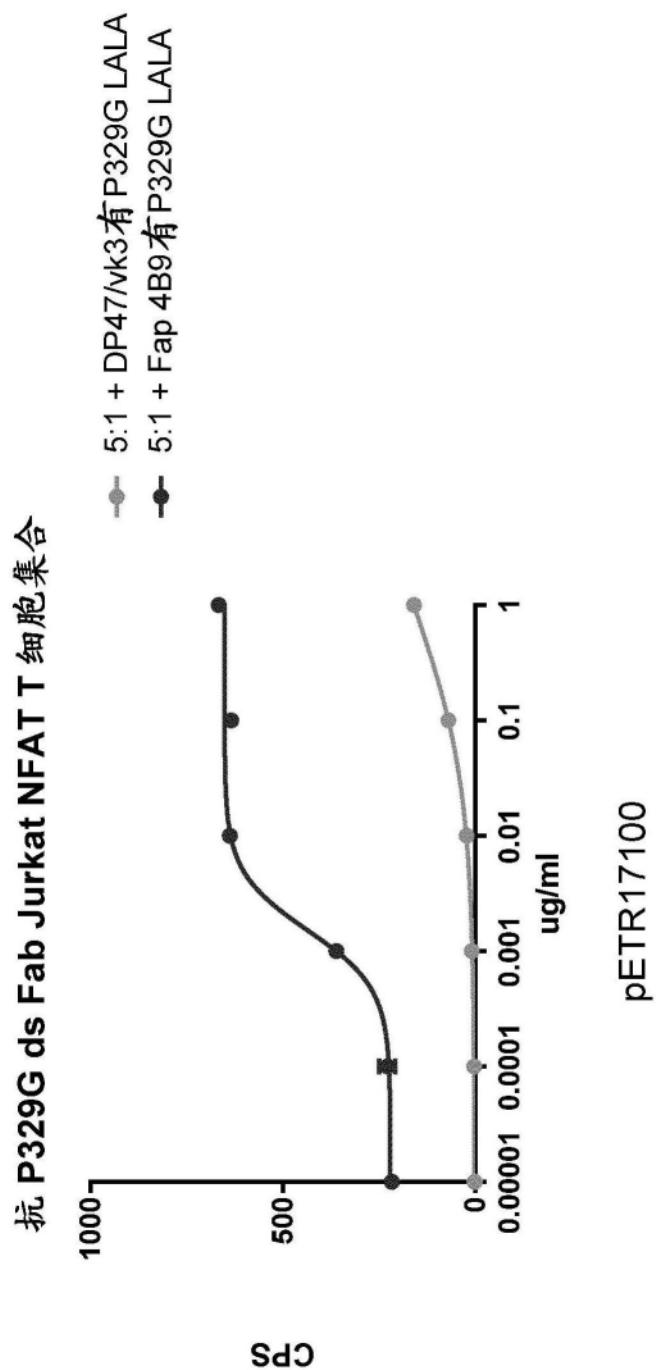


图8A

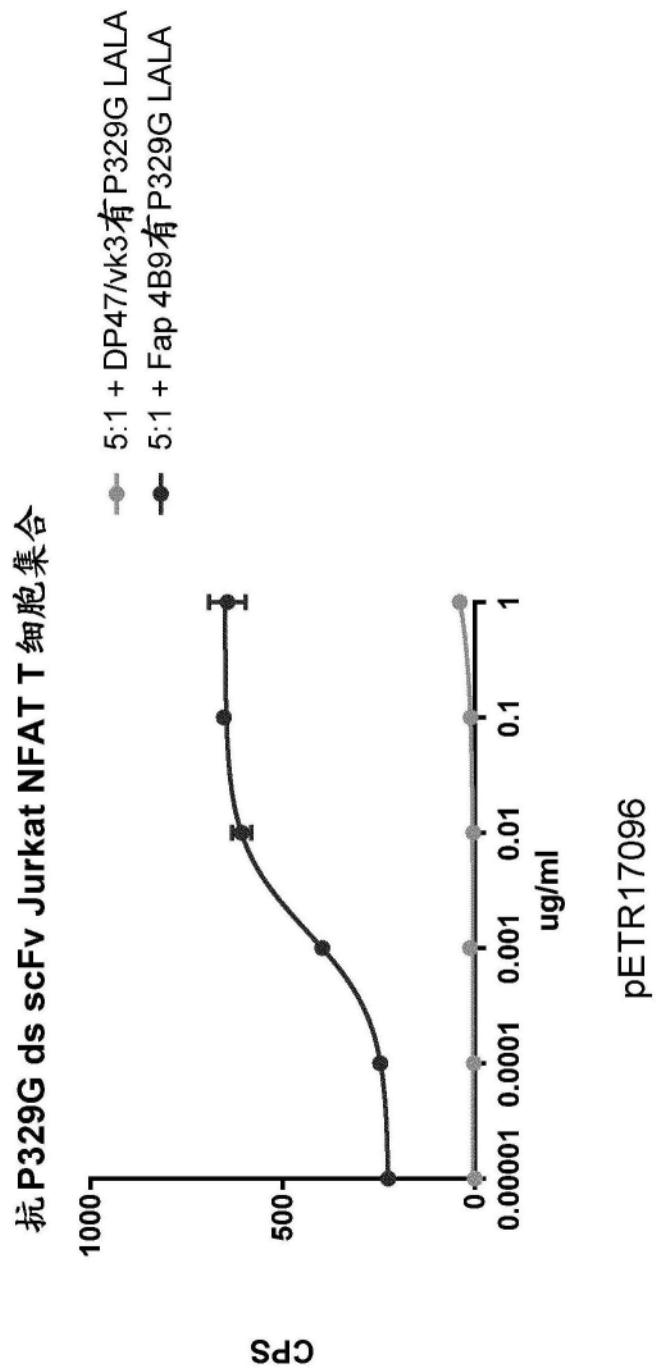


图8B

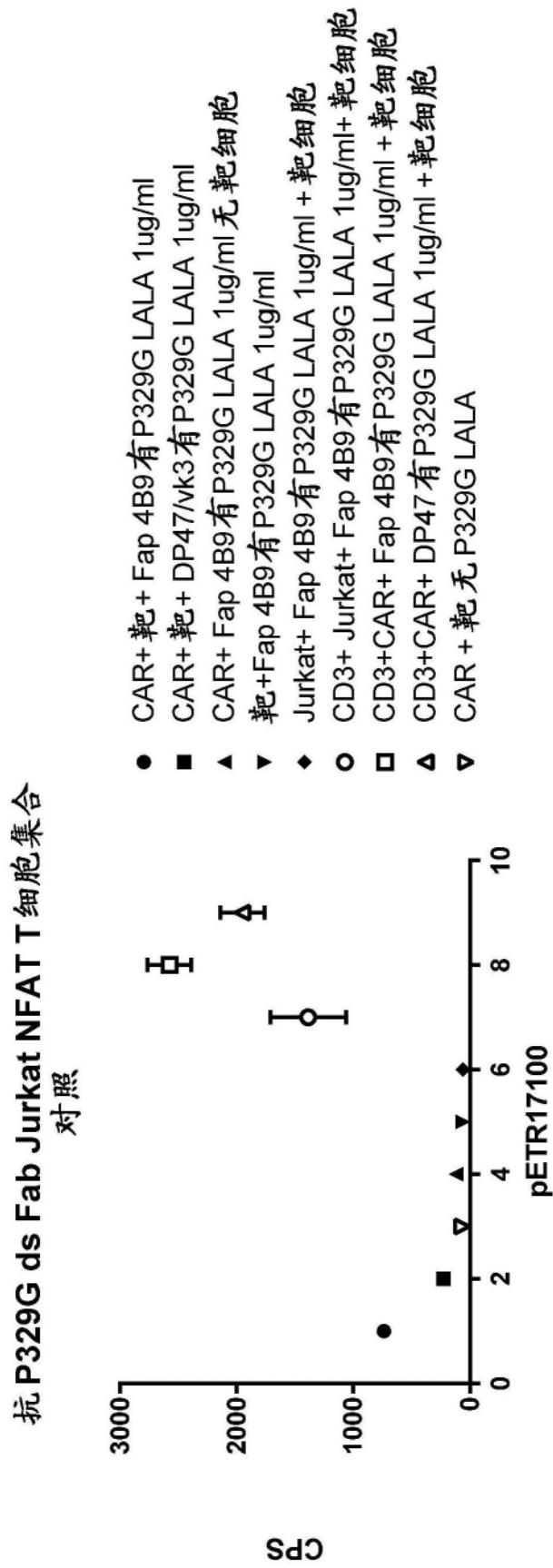


图8C

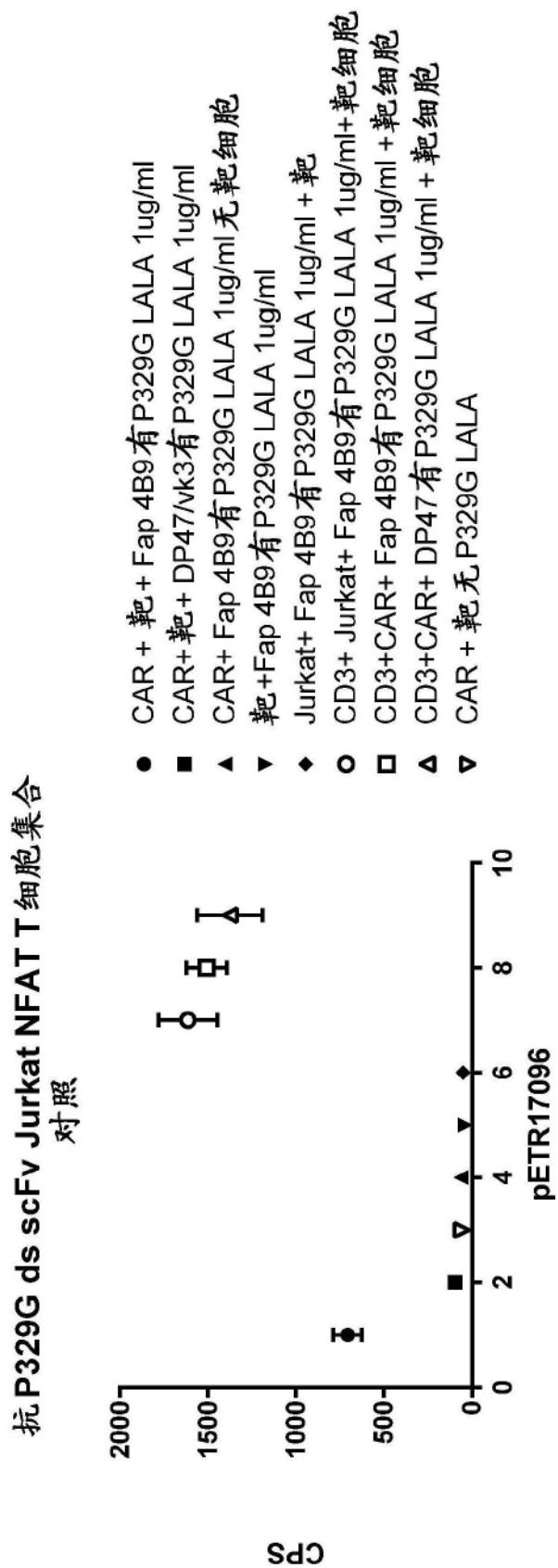
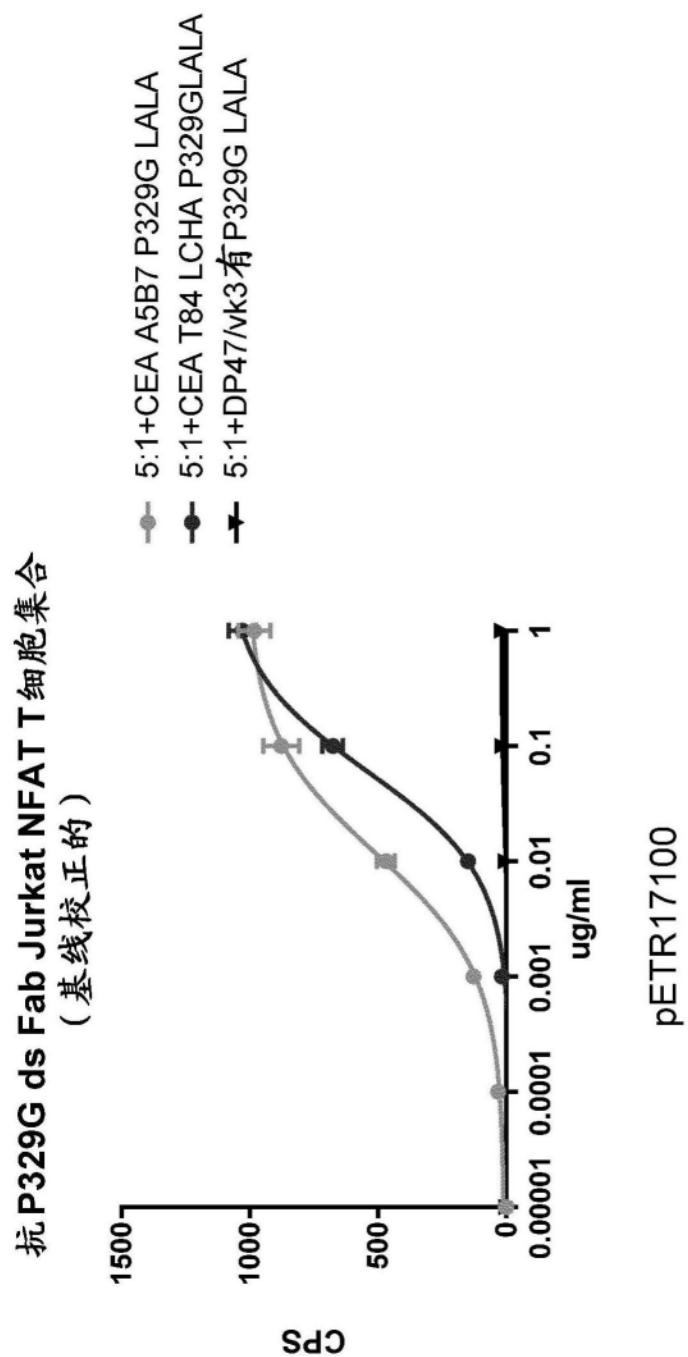


图8D



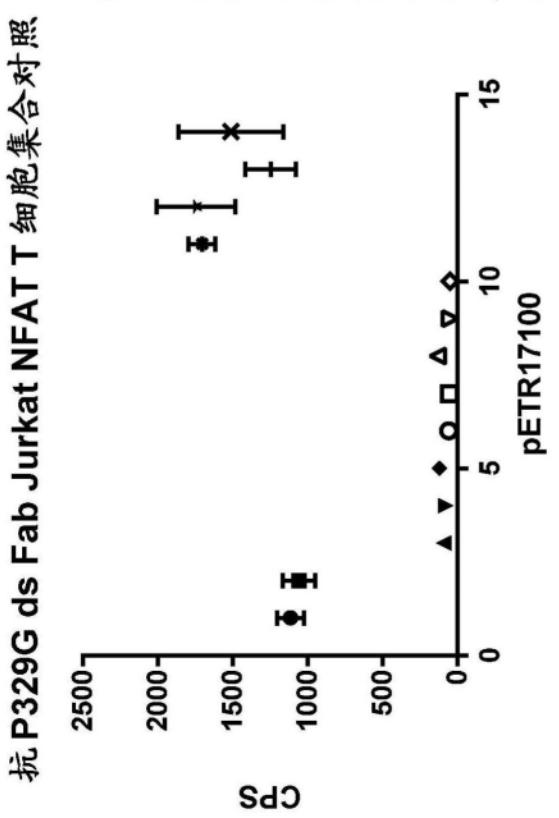


图9B

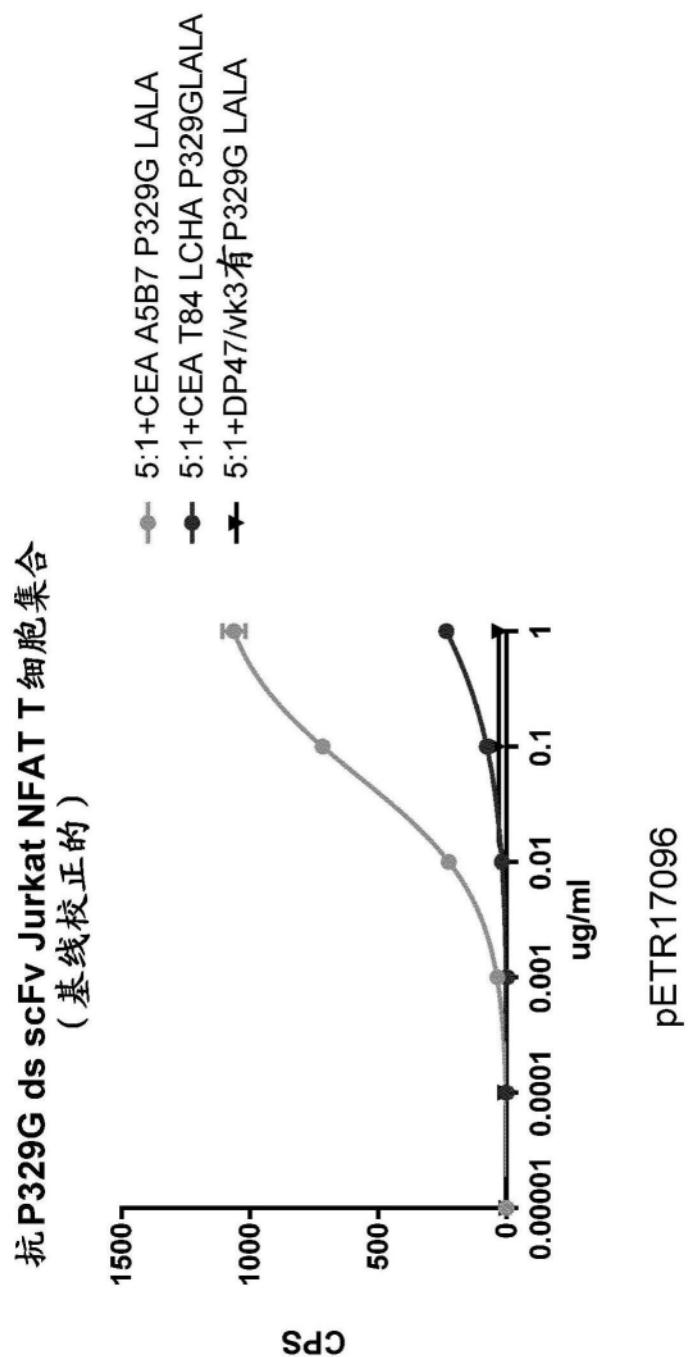


图9C

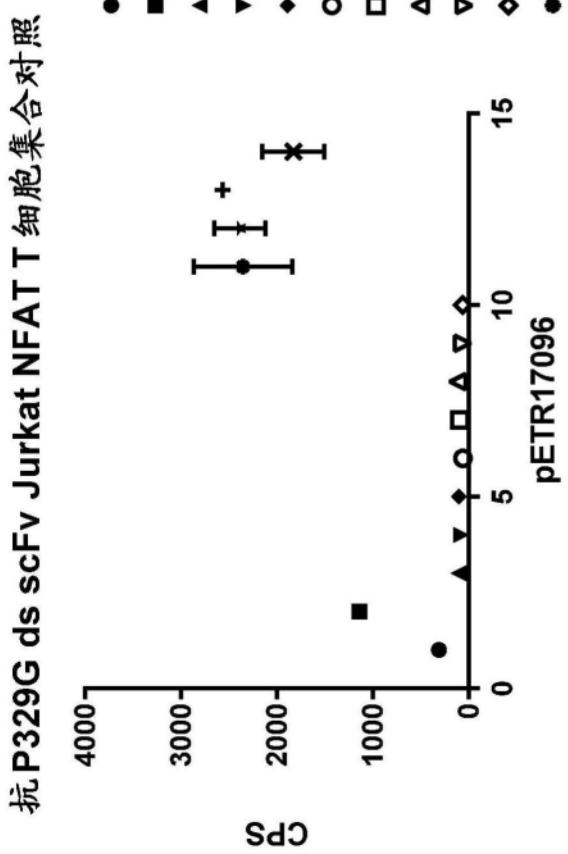


图9D

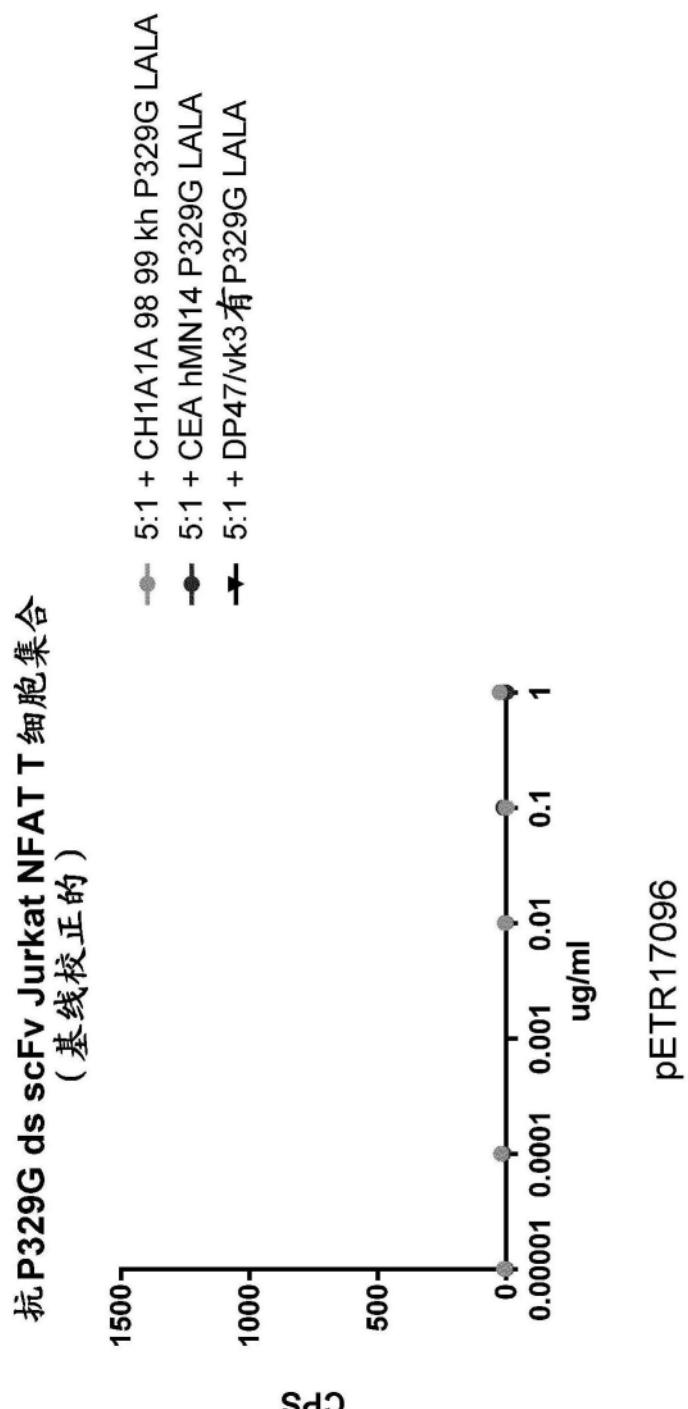


图10A

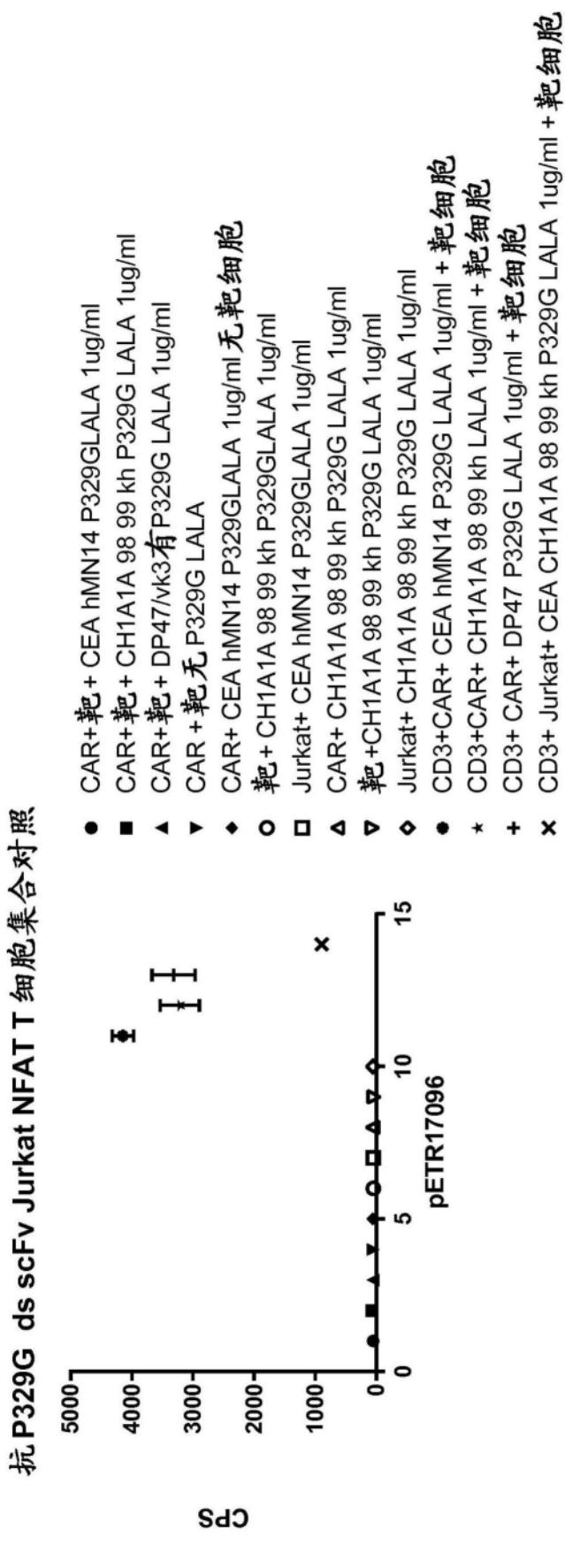


图10B

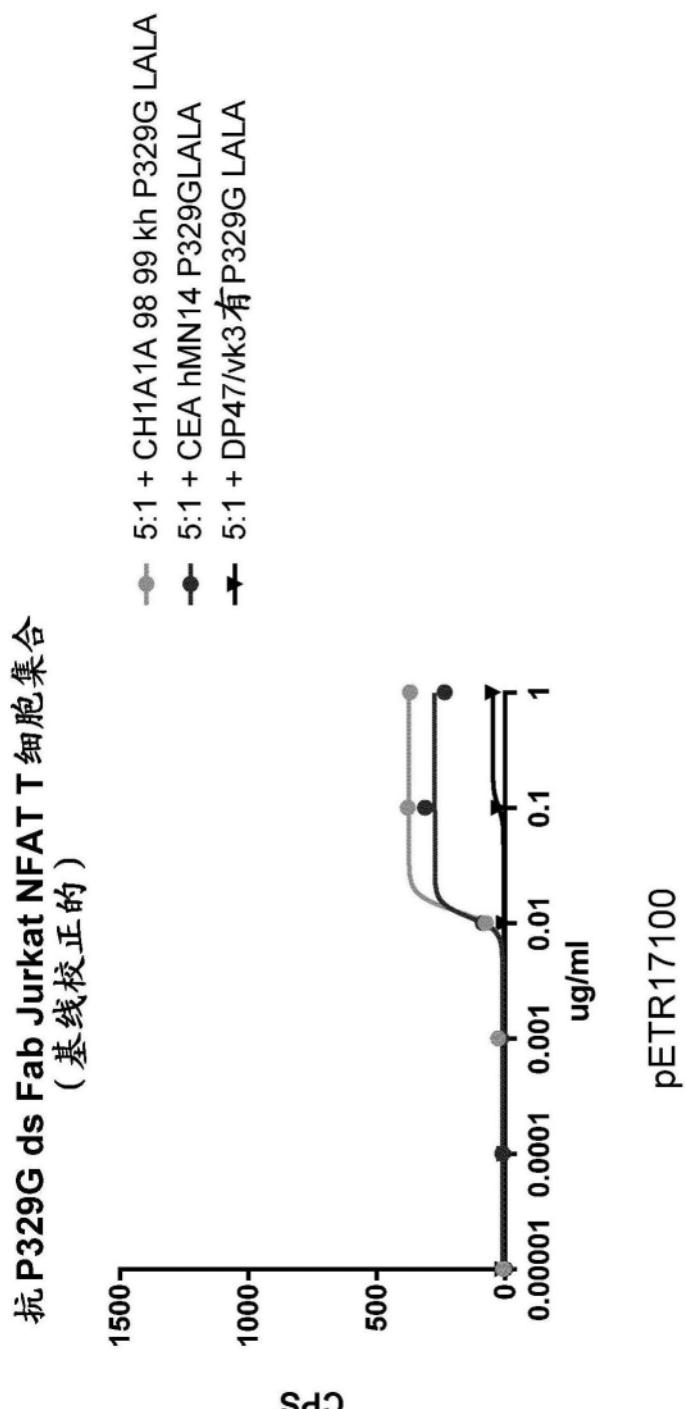


图10C

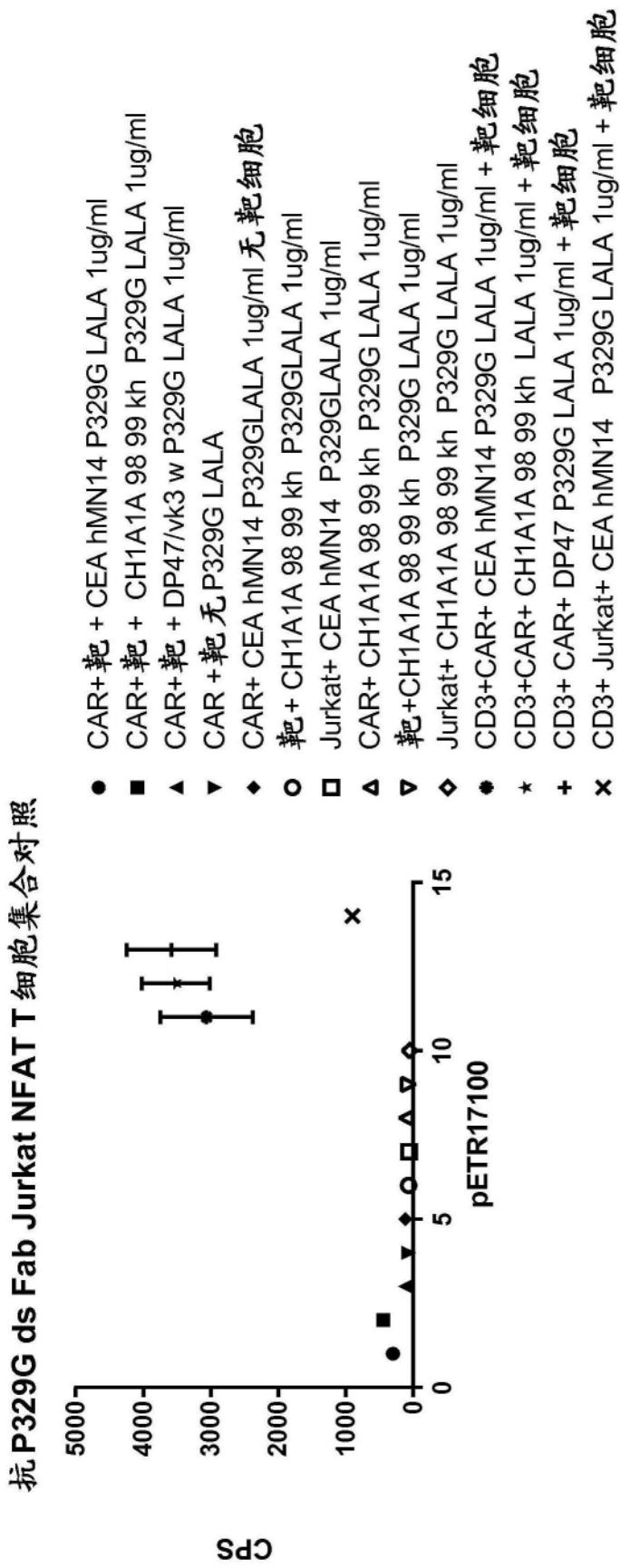


图10D

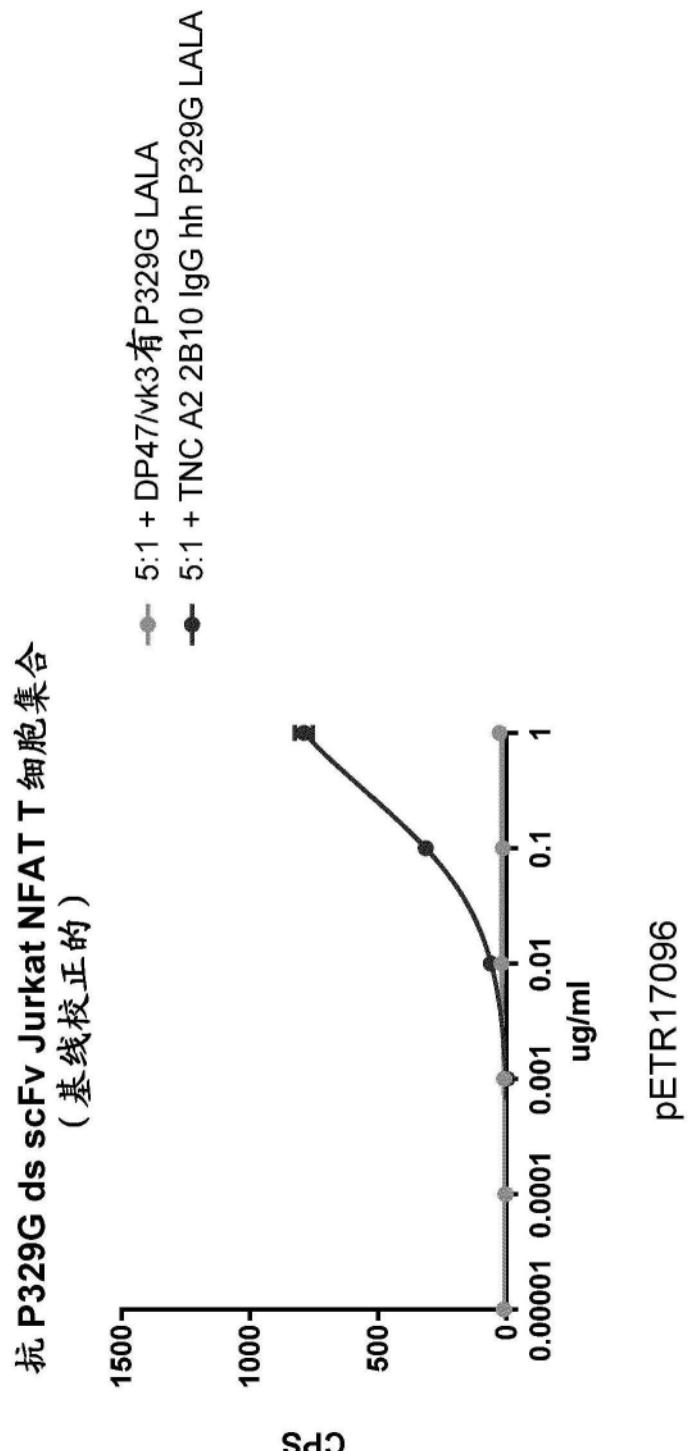


图11A

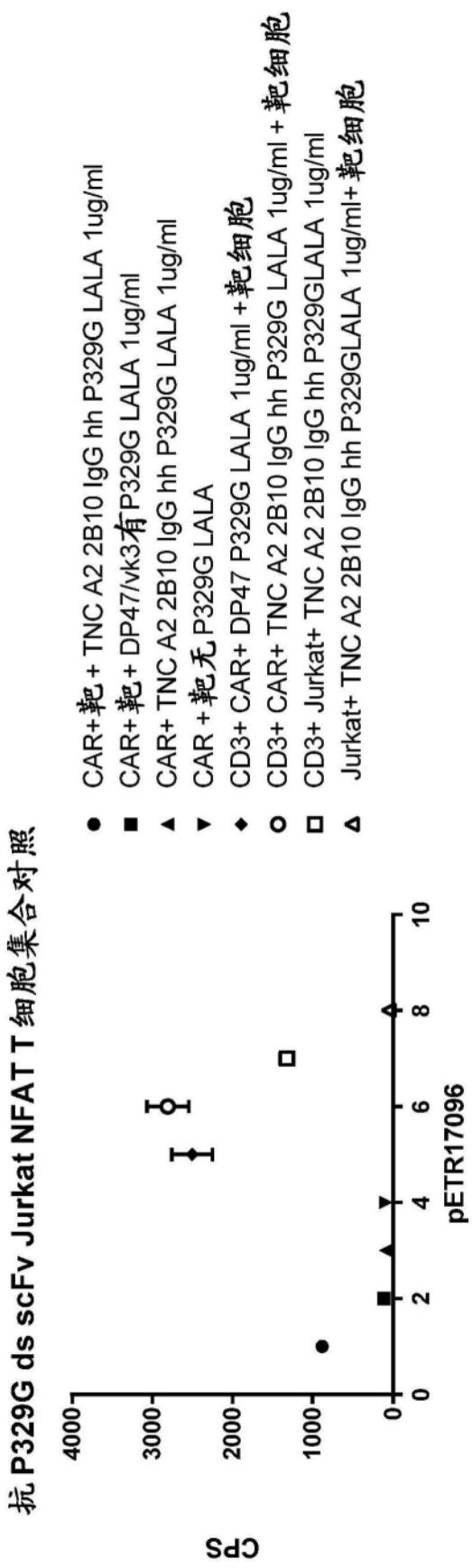


图11B

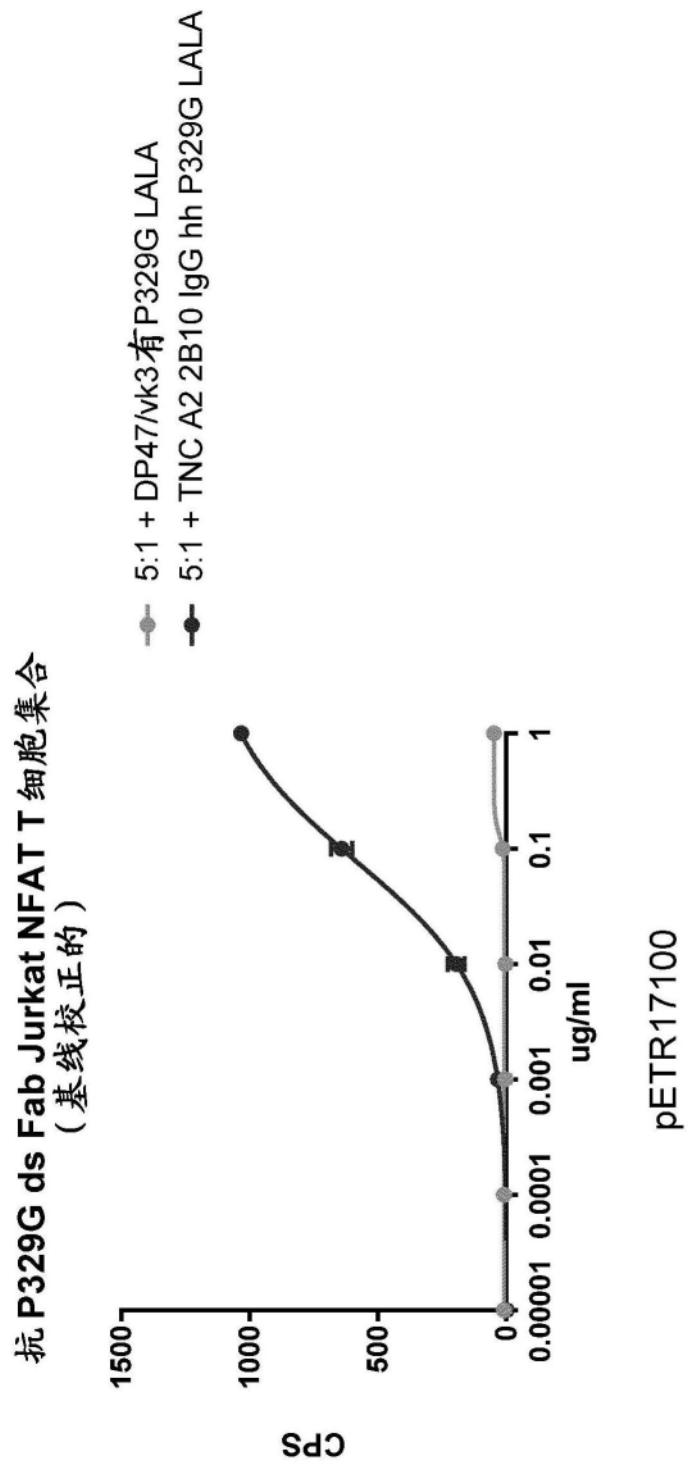


图11C

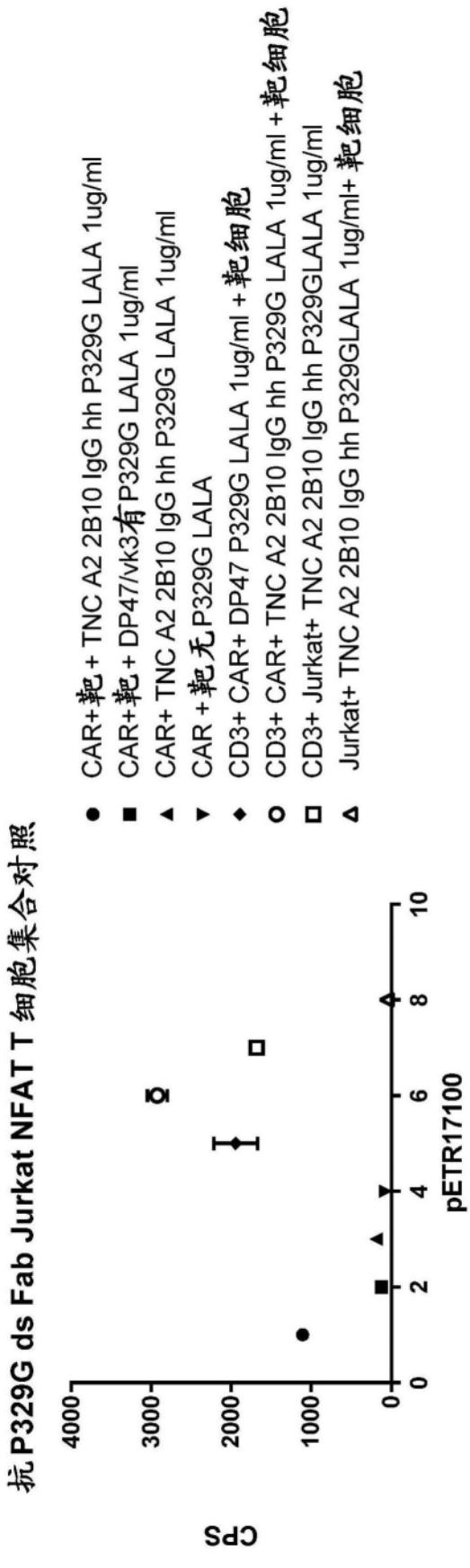


图11D

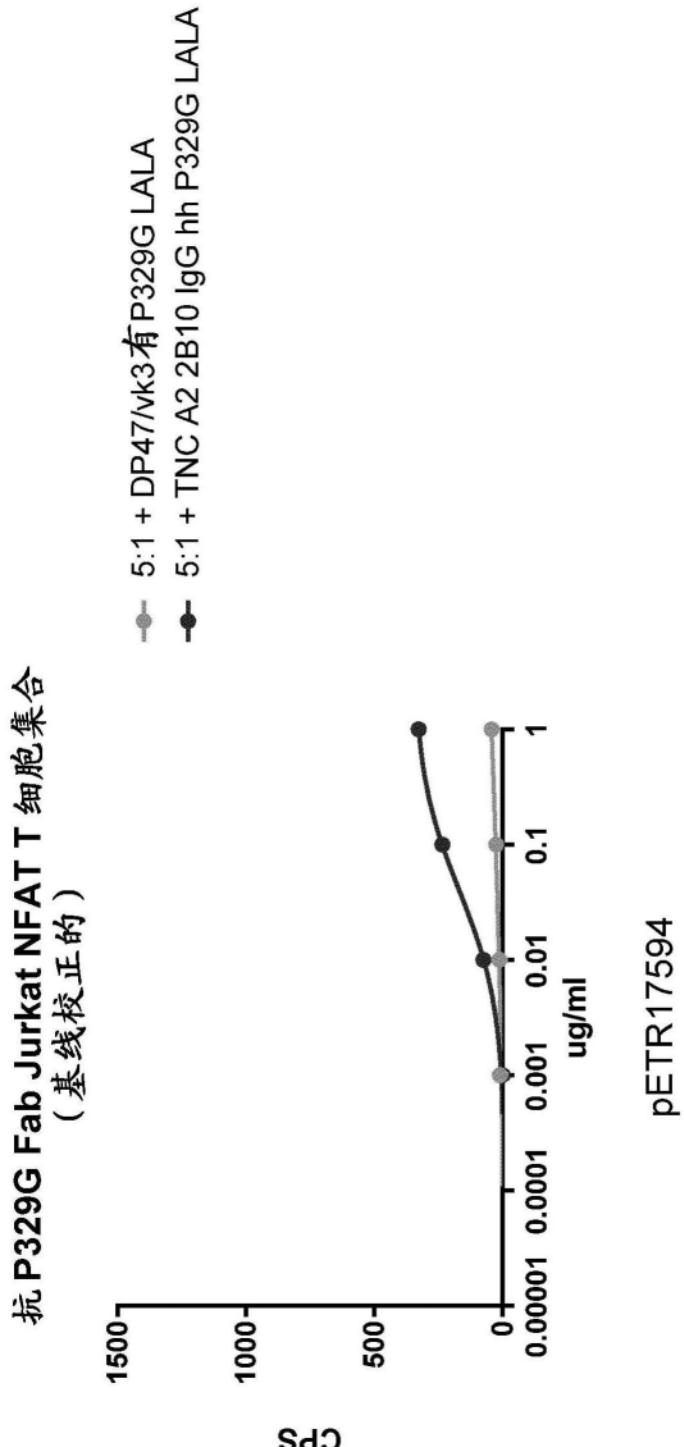


图12A

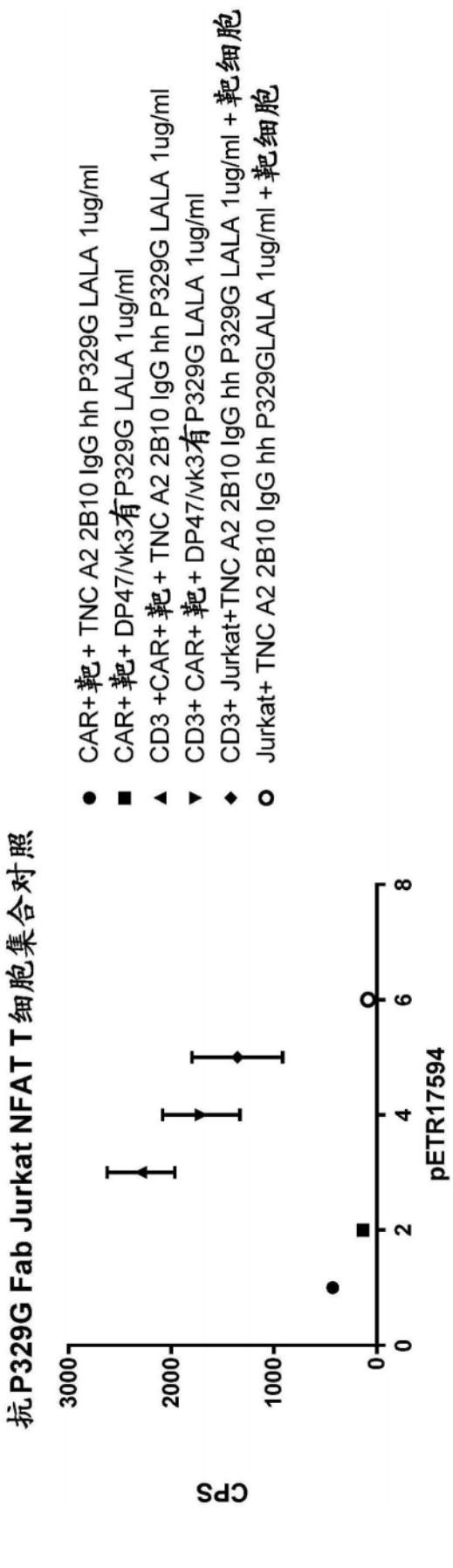


图12B

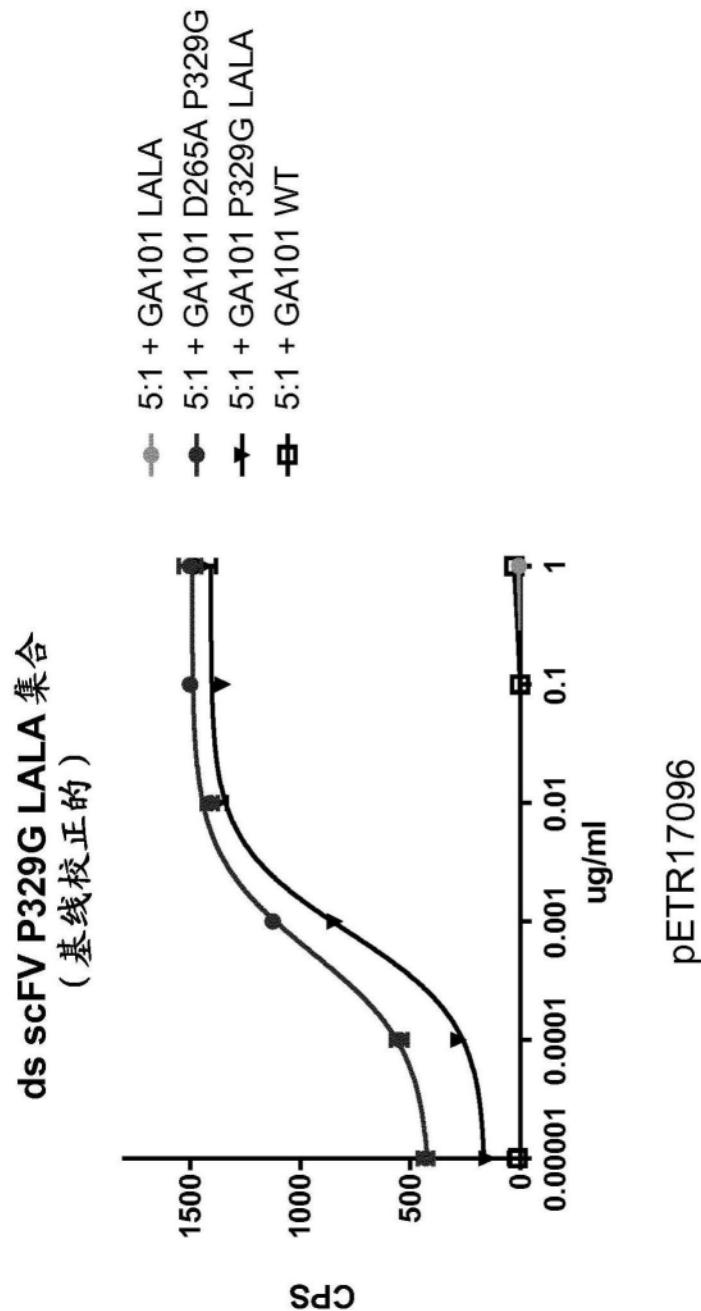


图13A

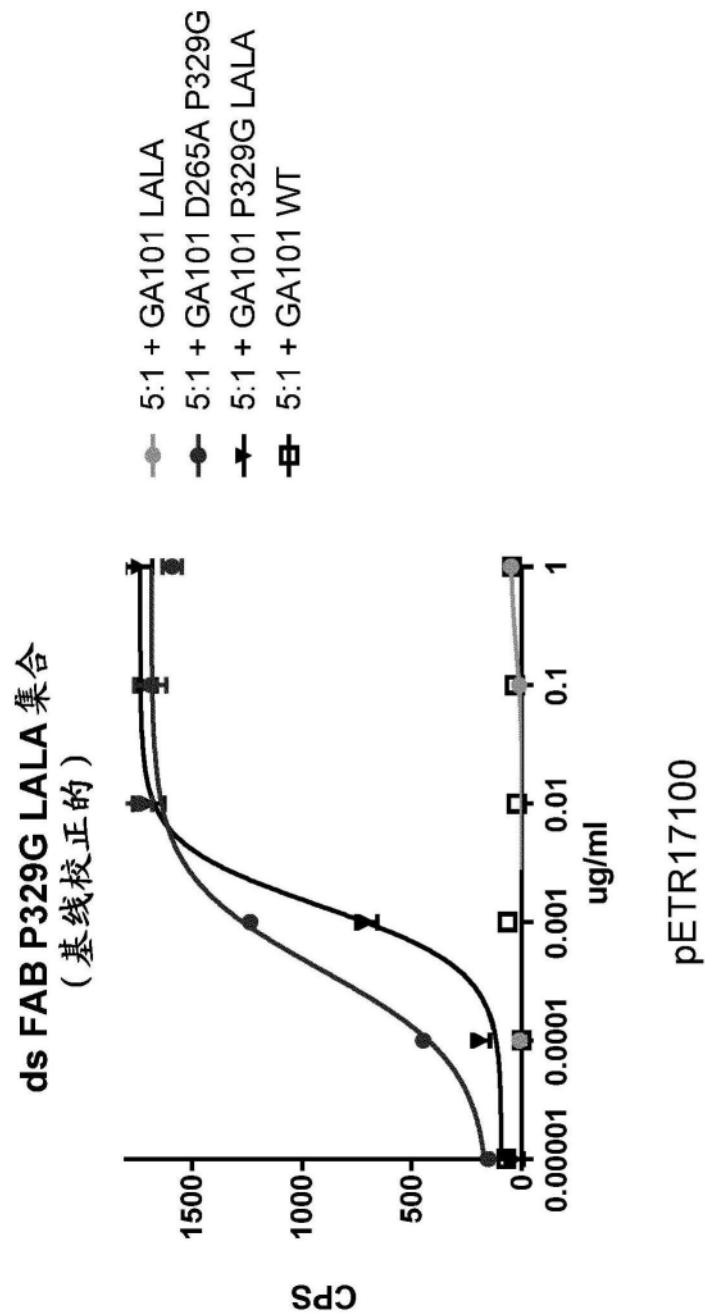


图13B

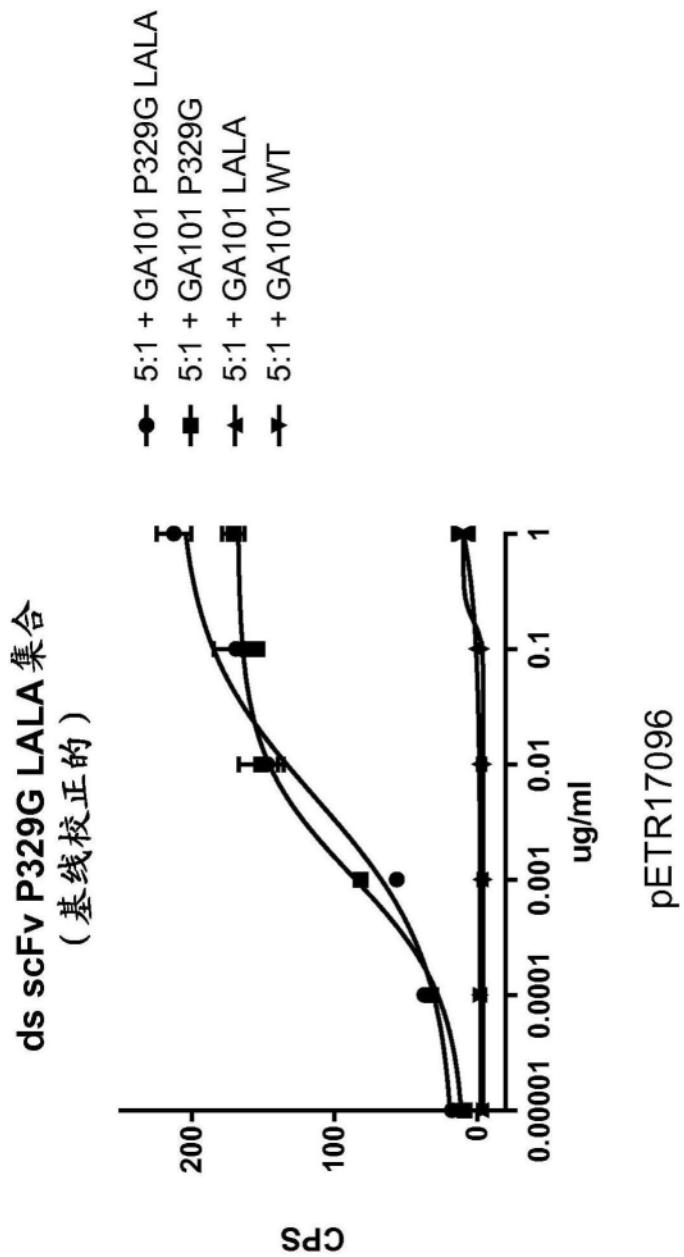


图14A

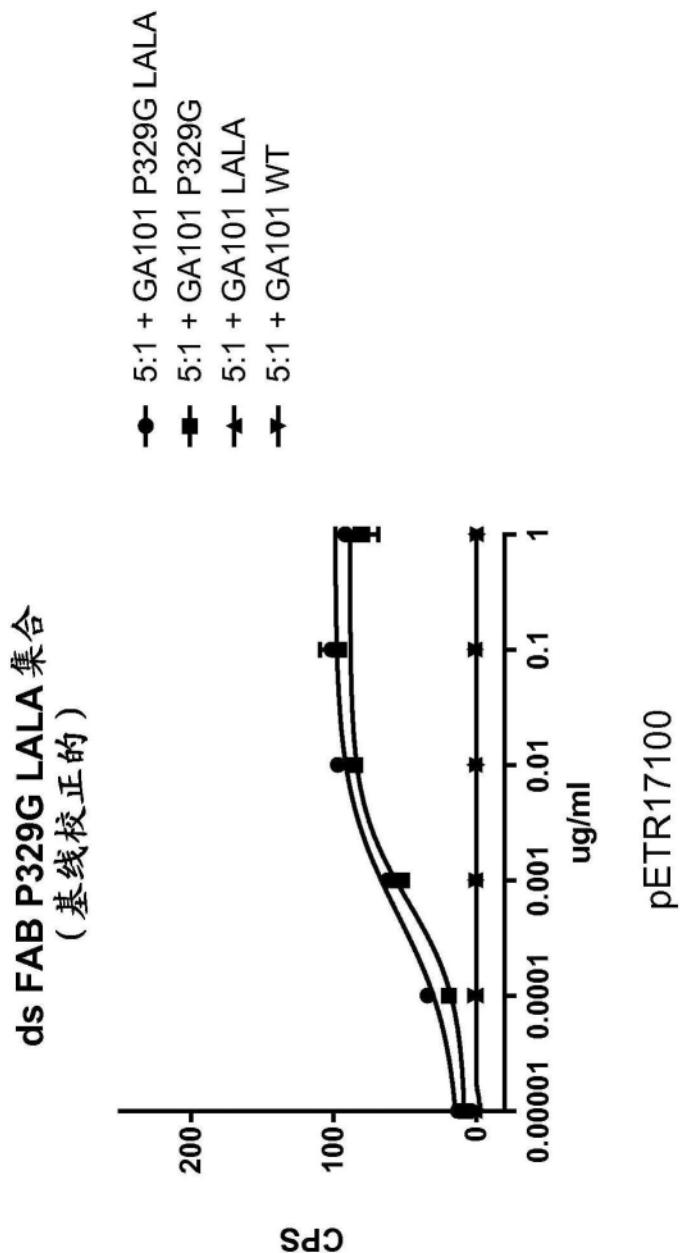


图14B