



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I835848 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：108132177 (22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl. : C07K14/725 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01) C07K16/28 (2006.01)
C07K19/00 (2006.01) C12N5/075 (2010.01)
C12N15/85 (2006.01)

(30)優先權：2018/09/07 美國 16/125,302

(71)申請人：美商拜奧亞特拉公司 (美國) BIOATLA, LLC (US)
美國

(72)發明人：休特 杰 M SHORT, JAY M. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN	107074975A	US	2013/0280220A1
US	2017/0247685A1	WO	2014/127261A1

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：14 共 169 頁

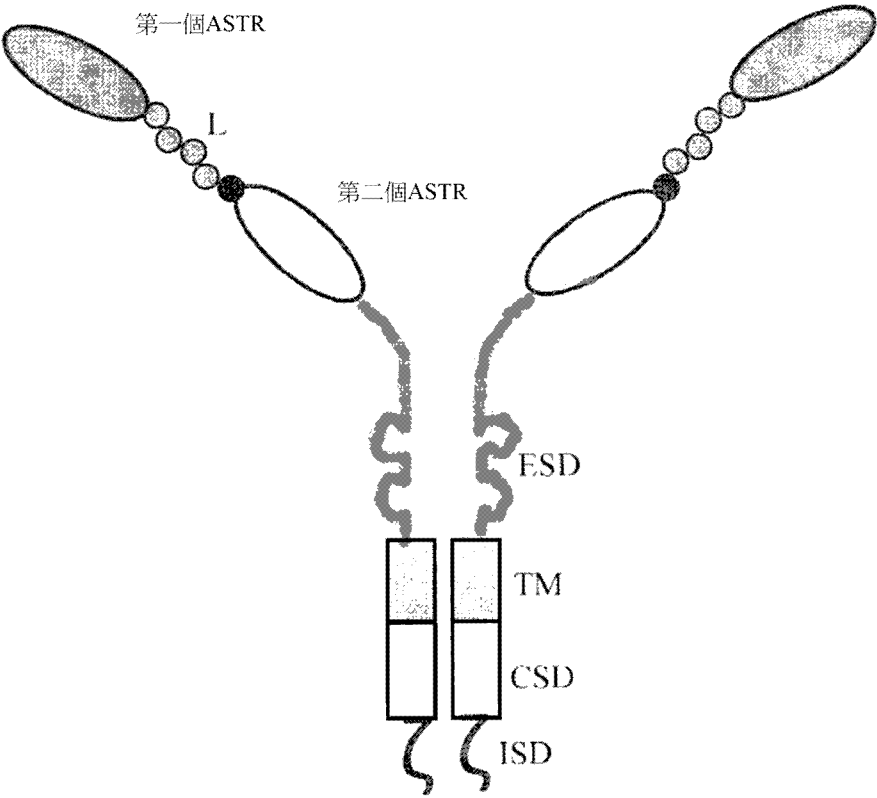
(54)名稱
經改造 T 細胞之條件活性嵌合抗原受體

(57)摘要

本發明係關於一種用於與腫瘤特異性靶抗原結合之嵌合抗原受體。該嵌合抗原受體包含至少一個自親本蛋白質或其片段進化且相比於在異常條件下分析中之活性，在正常生理條件下分析中之活性降低的抗原特異性靶向區。亦提供一種用於產生該嵌合抗原受體之方法。

This disclosure relates to a chimeric antigen receptor for binding with a tumor specific target antigen. The chimeric antigen receptor comprises at least one antigen specific targeting region evolved from a parent protein or a fragment thereof and having a decrease in activity in the assay at the normal physiological condition compared to the activity in the assay under the aberrant condition. A method for producing the chimeric antigen receptor is also provided.

指定代表圖：



【圖1】



I835848

【發明摘要】

【中文發明名稱】

經改造T細胞之條件活性嵌合抗原受體

【英文發明名稱】

CONDITIONALLY ACTIVE CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS
FOR MODIFIED T-CELLS

【中文】

本發明係關於一種用於與腫瘤特異性靶抗原結合之嵌合抗原受體。該嵌合抗原受體包含至少一個自親本蛋白質或其片段進化且相比於在異常條件下分析中之活性，在正常生理條件下分析中之活性降低的抗原特異性靶向區。亦提供一種用於產生該嵌合抗原受體之方法。

【英文】

This disclosure relates to a chimeric antigen receptor for binding with a tumor specific target antigen. The chimeric antigen receptor comprises at least one antigen specific targeting region evolved from a parent protein or a fragment thereof and having a decrease in activity in the assay at the normal physiological condition compared to the activity in the assay under the aberrant condition. A method for producing the chimeric antigen receptor is also provided.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

經改造T細胞之條件活性嵌合抗原受體

【英文發明名稱】

CONDITIONALLY ACTIVE CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS
FOR MODIFIED T-CELLS

【技術領域】

【0001】本發明係關於蛋白質進化之領域。具體言之，本發明係關於一種自親本或野生型蛋白質生成條件活性嵌合抗原受體之方法。條件活性嵌合抗原受體在野生型正常生理條件下可逆地或不可逆地失活，但在異常條件下為活性的。

【先前技術】

【0002】大量文獻描述針對多種特性之進化的蛋白質，尤其酶之可能性。舉例而言，酶可進化以在不同條件下，諸如在高溫下操作穩定。在高溫下存在活性提高之情形下，提高之大部分可歸因於通常由Q10規則描述之較高動力活性，其中據估計，在酶之情況下，每增加10°C周轉加倍。

【0003】另外，存在使蛋白質在其正常操作條件下去穩定化之天然突變之實例。某些突變體可在較低溫度下為活性的，但相比於親本或野生型蛋白質水準降低。此亦典型地由如Q10或類似定則所指導之活性減少描述。

【0004】需要產生條件活化之適用的分子。舉例而言，需要產生在野生型操作條件下幾乎失活，但在除野生型操作條件外下為活性的分子，其水準等於或優於野生型操作條件，或在某些微環境中活化或失活或隨時

間推移活化或失活。除溫度外，蛋白質可進化或最佳化之其他條件包括 pH、滲透壓、重量莫耳滲透濃度、氧化壓力及電解質濃度。在進化期間可最佳化之其他所需特性包括耐化學性及耐蛋白水解性。

【0005】已公佈用於進化或工程改造分子之多種策略。然而，將蛋白質工程改造或進化為在野生型操作條件下失活或幾乎失活(小於10%活性且較佳小於1%活性)，同時保持與其對應親本或野生型蛋白質相比在除野生型操作條件外之條件下活性等效或更佳需要在活性提高不會抵消不穩定作用之突變之情況下使共存突變去穩定化。預期去穩定化將降低蛋白質活性大於諸如Q10之標準定則所預測之效果。因此，進化蛋白質以在較低溫度下高效地起作用，例如同時在對應親本或野生型蛋白質之正常操作條件下失活之能力產生出人意料之新穎類別之蛋白質。

【0006】嵌合抗原受體(CAR)已用於治療癌症。US 2013/0280220揭示提供編碼對兩種或多於兩種抗原，包括腫瘤抗原具有特異性的嵌合抗原受體之改良細胞的方法及組合物。表現嵌合抗原受體之細胞可用於細胞療法中。此類細胞療法可適用於任何醫學病況，但在特定實施例中，細胞療法用於癌症，包括涉及實體腫瘤之癌症。

【0007】本發明提供在正常生理條件下失活或活性較低但在異常生理條件下為活性之經工程改造之條件活性嵌合抗原受體。

【0008】在整個本申請案中，各種公開案藉由作者及日期引用。此等公開案之揭示內容在此以全文引用之方式併入本申請案中以便更完整描述熟習此項技術者已知的目前先進技術，其中截至本文中所描述及主張之揭示內容。

【發明內容】

【0009】在一個態樣中，本發明提供一種用於與腫瘤特異性靶抗原結合之嵌合抗原受體(CAR)。該嵌合抗原受體包含至少一個自親本蛋白質或其域進化之抗原特異性靶向區。CAR進一步包含跨膜域及細胞內信號傳導域。相比於在異常條件下分析中之活性，至少一個抗原特異性靶向區在正常生理條件下分析中之活性降低。

【0010】在另一態樣中，本發明提供一種包括編碼本發明之嵌合抗原受體之聚核苷酸序列之表現載體。表現載體選自慢病毒載體、 γ 反轉錄病毒載體、泡沫病毒載體、腺相關病毒載體、腺病毒載體、痘病毒載體、疱疹病毒載體、經工程改造之混雜病毒及轉座子介導之載體。

【0011】在又另一態樣中，本發明提供一種包括編碼本發明之嵌合抗原受體之聚核苷酸序列的經基因工程改造之細胞毒性細胞。細胞毒性細胞可為T細胞且可選自原初T細胞、中樞記憶T細胞及效應記憶T細胞。

【0012】在又另一態樣中，本發明提供一種包括本發明之嵌合抗原受體、表現載體及/或經基因工程改造之細胞毒性細胞及醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

【0013】在又另一態樣中，本發明提供一種用於產生包含至少一個抗原特異性靶向區、跨膜域及細胞內信號傳導域之嵌合抗原受體之方法。該方法包含自與腫瘤特異性靶抗原特異性結合之親本蛋白質或其域生成至少一個抗原特異性靶向區的步驟。此等步驟包括(i)使用一或多種進化技術使編碼親本或野生型蛋白質或其域之DNA進化以產生突變DNA；(ii)使突變DNA表現以獲得突變多肽；(iii)使突變多肽經受在正常生理條件下之分析及在異常條件下之分析；及(iv)自步驟(iii)中表現之突變多肽選擇至少一個抗原特異性靶向區，其展現相比於在異常條件下分析中之活性，在正常生理條件下分析中之活性降低。

【圖式簡單說明】

【0014】圖1描繪根據本發明之一個實施例之嵌合抗原受體的示意性圖示。ASTR為抗原特異性靶向區，L為連接子，ESD為細胞外間隔子域，TM為跨膜域，CSD為協同刺激域，且ISD為細胞內信號傳導域。

【0015】圖2及3展示實例1之條件活性抗體表現為不會明顯改變此等抗體在pH 6.0及超過pH 7.4下之選擇性的二價或單價抗體。

【0016】圖4為指示實例2之條件活性抗體不會聚集之尺寸排除層析之曲線。

【0017】圖5展示如藉由表面電漿子共振(SPR)分析所量測之實例2之條件活性抗體之開啟及關閉速率。

【0018】圖6A-6B展示如藉由實例2之SPR分析所量測之條件活性抗體之選擇性。

【0019】圖7A展示CAR-T細胞對不會表現CAR-T細胞之靶抗原X1之CHO細胞群體無作用。此實例之CAR-T細胞中之CAR分子包括針對靶抗原X1之抗體，但此抗體非條件活性(比較實例A)。

【0020】圖7B展示CAR-T細胞減少表現CAR-T細胞之靶抗原X1之CHO-63細胞群體。此等CAR-T細胞為與用於產生圖7A (比較實例A)中所展示之資料相同的細胞。

【0021】圖8A展示CAR-T細胞對不會表現CAR-T細胞之靶抗原X1之CHO細胞群體無作用。此實例3之CAR-T細胞中之CAR分子包括針對靶抗原X1之條件活性抗體。

【0022】圖8B展示CAR-T細胞減少表現如實例3中所測試之CAR-T細胞之靶抗原X1的CHO-63細胞群體。此等CAR-T細胞為與用於產生圖

8A中所展示之資料相同的細胞。

【0023】圖9A-9B展示如實例3中所描述之CAR-T細胞與靶抗原X1之結合所誘發之細胞介素釋放。

【0024】圖10展示針對靶抗原X2之條件活性抗體。

【0025】圖11A-11B展示結合至表現靶抗原X2 (A)之道迪(Daudi)細胞之CAR-T細胞所誘發之細胞毒性作用及不會表現靶抗原X2 (B)之HEK293細胞上CAR-T細胞所誘發之細胞毒性作用，如實例4中所描述。

【0026】圖12A-12B展示如實例5中所描述之CAR-T細胞與靶抗原X1之結合所誘發之細胞介素釋放。

【0027】圖13A-13B展示如實例5中所描述之CAR-T細胞與靶抗原X2之結合所誘發之細胞介素釋放。

【0028】圖14展示適用於建構CAR-T細胞之針對靶抗原X3之條件活性抗體。

【實施方式】

相關申請案資料

【0029】本申請案為2018年8月2日申請之美國專利申請案第16/053,166號之部分接續申請案，目前在申請中，其又為現已廢棄之美國專利申請案第15/052,487號之分案，其又為2015年8月27日申請之國際申請案第PCT/US15/47197號之部分接續申請案且其指定美國，其又主張現已過期之2014年8月28日申請之美國臨時申請案第62/043,067號之效益，該等申請案均在此以全文引用之方式併入。

定義

【0030】為了促進對本文所提供之實例的理解，本文將對某些頻繁出現之方法及/或術語加以定義。

【0031】如本文所使用，關於所量測之數量，術語「約」係指熟習此項技術者所預期使量測及操作與量測之目的及所用量測設備之精確度在所關心之量上相匹配的量測量之正常變化。除非另外指明，否則「約」係指所提供之值的 $\pm 10\%$ 之變化。

【0032】術語「藥劑」在本文中用於表示化學化合物、化學化合物之混合物、空間定位化合物之陣列(例如VLSIPS肽陣列、聚核苷酸陣列及/或組合小分子陣列)、生物學大分子、噬菌體肽呈現庫、噬菌體抗體(例如scFv)呈現庫、多核糖體肽呈現庫或由諸如細菌、植物、真菌或動物(特定哺乳動物)細胞或組織之生物學材料製成之提取物。藉由包括於本文中下文所描述之篩選分析中來評估藥劑之潛在酶活性。藉由包括於本文中下文所描述之篩選分析中來評估藥劑作為條件活性生物治療酶之潛在活性。

【0033】如本文所使用，術語「胺基酸」係指含有胺基($--NH_2$)及羧基($--COOH$)之任何有機化合物；其較佳呈游離基團形式或者在縮合之後作為肽鍵之一部分。「二十個形成天然編碼之多肽的 α 胺基酸」在此項技術中已有所理解且係指：丙胺酸(ala或A)、精胺酸(arg或R)、天冬醯胺(asn或N)、天冬胺酸(asp或D)、半胱胺酸(cys或C)、麩胺酸(glu或E)、麩醯胺酸(gln或Q)、甘胺酸(gly或G)、組胺酸(his或H)、異白胺酸(ile或I)、白胺酸(leu或L)、離胺酸(lys或K)、甲硫胺酸(met或M)、苯丙胺酸(phe或F)、脯胺酸(pro或P)、絲胺酸(ser或S)、蘇胺酸(thr或T)、色胺酸(trp或W)、酪胺酸(tyr或Y)及纈胺酸(val或V)。

【0034】如本文所使用，術語「擴增」意謂聚核苷酸之複本數目提高。

【0035】如本文所使用，術語「抗體」係指能夠結合於抗原之抗原決定基的完整免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白分子之片段，諸如Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv及SCA片段。此等抗體片段可使用此項技術中熟知之方法製得(參見例如Harlow及Lane,同上)且如下進一步描述，該等抗體片段保留一定的與其所源於之抗體之抗原(例如多肽抗原)選擇性結合的能力。抗體可用於藉由免疫親和層析法分離製備量之抗原。此類抗體之各種其他用途係診斷及/或分級疾病(例如贅瘤形成)且用於治療疾病之治療性應用，該疾病係諸如：贅瘤形成、自體免疫性疾病、AIDS、心血管疾病、感染及其類似疾病。嵌合抗體、人類樣抗體、人類化抗體或全人類抗體尤其適用於向人類患者投與。

【0036】Fab片段由抗體分子之單價抗原結合片段組成，且可藉由用番木瓜蛋白酶消化全抗體分子來製造，產生由完整輕鏈及一部分重鏈組成之片段。

【0037】抗體分子之Fab'片段可藉由用胃蛋白酶處理全抗體分子、之後還原而獲得，產生由完整輕鏈及一部分重鏈組成分子。每個以此方式處理的抗體分子獲得兩個Fab'片段。

【0038】抗體之(Fab')₂片段可在無後續還原下藉由用胃蛋白酶處理全抗體分子獲得。(Fab')₂片段係兩個Fab'片段之二聚體，藉由兩個二硫鍵結合在一起。

【0039】Fv片段定義為含有輕鏈可變區及重鏈可變區且表現為兩條鏈之經基因工程改造之片段。

【0040】如本文所使用之術語「抗原」或「Ag」定義為引起免疫反應之分子。此免疫反應可能涉及抗體產生或特異免疫勝任細胞之活化或兩者。熟習此項技術者將理解包括幾乎所有蛋白質或肽之任何大分子可充當抗原。此外，抗原可來源於重組或基因組DNA。熟習此項技術者將理解，包括編碼引發免疫反應之蛋白的核苷酸序列或部分核苷酸序列之任何DNA由此對如本文所使用之術語的「抗原」進行編碼。此外，熟習此項技術者將理解抗原無需僅藉由基因之核苷酸序列全長編碼。顯而易見，本發明包括(但不限於)多於一個基因之部分核苷酸序列之用途且此等核苷酸序列以各種組合排列以編碼引發所需免疫反應之多肽。另外，熟習此項技術者將理解，抗原完全不必由「基因」編碼。顯而易見，抗原可由生物樣品產生、合成或自其衍生。此類生物樣品可包括(但不限於)組織樣品、腫瘤樣品、細胞或生物流體。

【0041】如本文所使用，「抗原缺失逃避變異體」係指展現靶抗原之表現減少或缺失之細胞，該等抗原藉由本發明之CAR靶向。

【0042】如本文所使用，術語「自體免疫疾病」定義為由自體免疫反應產生之病症。自體免疫疾病為對自身抗原不當且過度反應之結果。自體免疫疾病之實例尤其包括(但不限於)艾迪森氏病(Addison's disease)、斑禿、僵直性脊椎炎、自體免疫肝炎、自體免疫腮腺炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、糖尿病(1型)、營養不良大疱性表皮鬆解、附睪炎、絲球體腎炎、格雷夫氏病(Graves' disease)、格林-巴爾症候群(Guillain-Barr syndrome)、橋本氏病(Hashimoto's disease)、溶血性貧血、全身性紅斑性狼瘡症、多發性硬化症、重症肌無力、尋常天疱瘡、牛皮癬、風濕熱、類風濕性關節炎、類肉瘤病、硬皮病、休格連氏症候群(Sjogren's

syndrome)、脊椎關節病、甲狀腺炎、血管炎、白斑病、黏液腺瘤、惡性貧血、潰瘍性結腸炎。

【0043】如本文所使用，術語「自體」係指後續再引入之來源於相同個體之任何材料。舉例而言，來自患者之T細胞可經分離、經基因工程改造以表現CAR，且隨後再引入至患者中。

【0044】如本文所使用，術語「B細胞相關疾病」包括與B細胞(包括淋巴瘤及/或白血病)相關之B細胞免疫缺乏症、自體免疫疾病及/或過度/不受控細胞增殖。此類疾病(其中本發明之雙特異性CAR可用於治療方法)之實例包括(但不限於)全身性紅斑性狼瘡症(SLE)、糖尿病、類風濕性關節炎(RA)、反應性關節炎、多發性硬化症(MS)、尋常天疱瘡、乳糜瀉、克羅恩氏病、發炎性腸病、潰瘍性結腸炎、自體免疫甲狀腺疾病、X性聯血中丙球蛋白貧乏、預B急性淋巴母細胞白血病、全身性紅斑性狼瘡症、常見變異型免疫缺失症、慢性淋巴球性白血病、與選擇性IgA缺乏症及/或IgG子類別缺乏症相關之疾病、B譜系淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及/或非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma))、免疫缺陷伴胸腺瘤、暫時性低 γ 球蛋白血症及/或高IgM症候群以及病毒介導之B細胞疾病，諸如EBV介導之淋巴增生疾病及B細胞參與病理生理學之慢性感染。

【0045】術語「血腦屏障」或「BBB」係指在周邊循環與大腦及脊髓之間的生理學屏障，其藉由腦毛細血管內皮膜內之緊密結合形成，產生限制分子，甚至極小分子(諸如脲(60道爾頓))輸送至大腦的緊密屏障。大腦內之血腦屏障、脊髓內之血液-脊髓屏障及視網膜內之血液-視網膜屏障為中樞神經系統(CNS)內的連續毛細管屏障，且在本文中統稱為「血腦屏

障」或「BBB」。當該屏障包括室管膜細胞(而非毛細管內皮細胞)時，BBB亦涵蓋血液-大腦脊髓液屏障(脈絡叢)。

【0046】如本文所使用之術語「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物中典型地以不受調節之細胞生長為特徵的生理病況。癌症之實例包括(但不限於)B細胞淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤及/或非霍奇金氏淋巴瘤)、腦瘤、乳癌、結腸癌、肺癌、肝細胞癌、胃癌、胰臟癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、泌尿道癌、甲狀腺癌、腎癌、癌瘤、黑色素瘤、頭頸癌、腦癌及前列腺癌，包括(但不限於)雄激素依賴性前列腺癌及雄激素非依賴性前列腺癌。

【0047】如本文所使用之術語「嵌合抗原受體」或「CAR」或「CARs」係指將抗原特異性移植於細胞毒性細胞，例如T細胞、NK細胞及巨噬細胞上之經工程改造之受體。本發明之CAR可包括至少一個抗原特異性靶向區(ASTR)、細胞外間隔子域(ESD)、跨膜域(TM)、一或多個協同刺激域(CSD)及細胞內信號傳導域(ISD)。在一個實施例中，ESD及/或CSD為視情況選用的。在另一實施例中，CAR為對兩種不同抗原或抗原決定基具有特異性的雙特異性CAR。在ASTR特異性結合至靶抗原之後，ISD活化細胞內信號傳導。舉例而言，ISD可以非MHC限制性方式，利用抗體之抗原結合特性重新引導針對所選標靶之T細胞特異性及反應性。非MHC限制性抗原識別賦予表現CAR之T細胞不依賴抗原加工識別抗原，從而繞過主要的腫瘤逃逸機制的的能力。另外，當在T細胞中表現時，CAR不宜與內源性T細胞受體(TCR) α 及 β 鏈二聚。

【0048】如本文所使用之術語「共表現」係指同時表現兩種或多於兩種基因。基因可為編碼例如單一蛋白質或呈單一多肽鏈形式之嵌合蛋白

之核酸。舉例而言，本發明之CAR可與治療對照物(例如截短表皮生長因子(EGFRt))共表現，其中CAR由第一聚核苷酸鏈編碼且治療對照物由第二聚核苷酸鏈編碼。在一個實施例中，第一及第二聚核苷酸鏈藉由編碼可裂解連接子之核酸序列連接。替代地，CAR及治療對照物由不經由連接子連接但實際上由例如兩種不同載體編碼之兩種不同聚核苷酸編碼。

【0049】如本文所使用之術語「同源」係指進化及物種之間功能相關之基因序列。舉例而言(但不限於)，在人類基因組中，人類CD4基因為小鼠3d4基因之同源基因，因為此兩個基因之序列及結構指示其高度同源且兩個基因編碼經由MHC II類限制性抗原識別在信號傳導T細胞活化中起作用之蛋白質。

【0050】術語「條件活性生物蛋白」係指在一或多種正常生理條件下與親本或野生型蛋白質相比活性更多或更少之親本或野生型蛋白質之變異體或突變體。此條件活性蛋白亦在身體之所選區域中展現出活性及/或在異常(或容許)生理條件下展現出增加或降低之活性。如本文所使用之術語「正常生理條件」係指溫度；pH；滲透壓；重量莫耳滲透濃度；氧化壓力；電解質濃度；較小有機分子，諸如葡萄糖、乳酸、丙酮酸、養分組分、其他代謝物及其類似物之濃度；其他分子，諸如氧、碳酸鹽、磷酸鹽及二氧化碳之濃度；以及細胞類型；及養分可用性中之一者，其將考慮在向個體投與位點處或作用位點處之組織或器官之正常範圍內。

【0051】在一個實施例中，正常生理條件為在大於7.0至約7.8，或約7.2至約7.8，或約7.2至約7.6，或約7.3至約7.6，或約7.3至約7.5範圍內之哺乳動物個體之血漿中之正常生理pH。異常條件為在約6.0至小於7.0，或約6.2至約6.9，或約6.0至約6.8，或約6.2至約6.8，或約6.4至約6.8，或

約6.4至約6.6範圍內之腫瘤微環境中之pH。

【0052】如本文所使用之術語「異常條件」係指偏離對彼條件正常可接受範圍之條件。在一個態樣中，條件活性生物蛋白在正常生理條件下幾乎失活，但在異常條件下為活性的，其水準等於或優於衍生其之親本或野生型蛋白質。舉例而言，在一個態樣中，進化的條件活性生物蛋白在體溫下幾乎失活，但在較低溫度下為活性的。在另一態樣中，條件活性生物蛋白在正常生理條件下可逆地或不可逆地失活。在另一態樣中，親本或野生型蛋白質為治療蛋白。在另一態樣中，條件活性生物蛋白用作藥物或治療劑。在又另一態樣中，蛋白質在高度含氧血液中，諸如在傳遞通過肺臟之後或在腎臟中可見之更低pH環境中活性更多或更少。

【0053】「保守性胺基酸取代」係指具有類似側鏈之殘基的可互換性。舉例而言，具有脂族側鏈之胺基酸群組係甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；具有脂族-羥基側鏈之胺基酸群組係絲胺酸及蘇胺酸；具有含醯胺側鏈之胺基酸群組係天冬醯胺及麩醯胺酸；具有芳族側鏈之胺基酸群組係苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸；具有鹼性側鏈之胺基酸群組係離胺酸、精胺酸及組胺酸；且具有含硫側鏈之胺基酸群組係半胱胺酸及甲硫胺酸。較佳保守胺基酸取代群組為：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸及天冬醯胺-麩醯胺酸。

【0054】術語「與……相對應」在本文中用於意謂聚核苷酸序列與參考聚核苷酸序列之全部或一部分同源(亦即一致，不嚴格地進化相關)，或多肽序列與參考多肽序列一致。對比之下，術語「與……互補」用於意謂互補序列與參考聚核苷酸序列之全部或一部分同源。為了說明，核苷酸序列「TATAC」與參考「TATAC」相對應且與參考序列「GTATA」互

補。

【0055】如本文所使用之術語「協同刺激配位體」包括特異性結合T細胞上之同源協同刺激分子的抗原呈遞細胞(例如樹突狀細胞、B細胞及其類似物)上之分子，由此提供信號，其除了藉由例如TCR/CD3複合物與裝載有肽之MHC分子結合所提供之初級信號之外介導T細胞反應，包括(但不限於)增殖、活化、分化及其類似者。協同刺激配位體可包括(但不限於) CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性協同刺激配位體(ICOS-L)、細胞間黏附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受體、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、結合至Toll配位體受體之促效劑或抗體，及特異性結合B7-H3之配位體。協同刺激配位體亦尤其涵蓋特異性結合存在於T細胞上之協同刺激分子之抗體，諸如(但不限於) CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及特異性結合CD83之配位體。

【0056】如本文所使用之術語「協同刺激分子」係指與協同刺激配位體特異性結合，藉此介導T細胞之協同刺激反應，諸如(但不限於)增殖的T細胞上之同源結合搭配物。協同刺激分子包括(但不限於) 1類MHC分子、BTLA及Toll配位體受體。

【0057】如本文所使用之術語「協同刺激信號」係指與諸如TCR/CD3接合之初級信號組合導致T細胞增殖及/或關鍵分子之上調或下調的信號。

【0058】如本文所使用之術語「細胞毒性細胞」意謂可損傷或破壞

侵入微生物之細胞、腫瘤細胞或其他患病組織細胞。此術語意欲包括自然殺手(NK)細胞、活化NK細胞、嗜中性白血球、T細胞、嗜酸性球、嗜鹼性球、B細胞、巨噬細胞及淋巴激素活化殺手(LAK)細胞以及其他細胞類型。細胞毒性細胞經由抗體、受體、配位體或片段/其衍生物結合至靶細胞以形成穩定複合物，且刺激細胞毒性細胞破壞靶細胞。

【0059】細胞毒性細胞亦可包括具有腫瘤溶解能力之其他免疫細胞，包括(但不限於)自然殺手T細胞(Heczey等人, 「Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy」, *Blood*, 第124卷, 第2824頁至第2833頁, 2014)及粒細胞。另外，細胞毒性細胞可包括具有吞噬細胞能力之免疫細胞，包括(但不限於)巨噬細胞及粒細胞；具有幹細胞及/或祖細胞特性之細胞，包括(但不限於)造血幹細胞/祖細胞(Zhen等人, 「HIV-specific Immunity Derived From Chimeric Antigen Receptor-engineered Stem Cells」, *Mol Ther.*, 第23卷, 第1358頁至第1367頁, 2015)；胚胎幹細胞(ESC)；臍帶血幹細胞；及經誘導之多能幹細胞(iPSC) (Themeli等人, 「New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy」, *Cell Stem Cell.*, 第16卷, 第357頁至第366頁, 2015)。另外，細胞毒性細胞包括「合成細胞」，諸如iPSC衍生之T細胞(TiPSC)(Themeli等人, 「Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy」, *Nat Biotechnol.*, 第31卷, 第928頁至第933頁, 2013) 或iPSC衍生之NK細胞。

【0060】術語「降解有效」量係指相比於不與酶接觸之受質，處理

至少50%受質所需要的酶之量。

【0061】術語「方向接合」係指聚核苷酸之5'端及3'端足夠不同以指明較佳接合定向之接合。舉例而言，當接合至消化之選殖載體以在其多個選殖位點中產生鈍端時，具有兩個鈍端之另外未經處理及未消化之PCR產物將典型地不具有較佳接合定向；因此，方向接合將典型地在此等情況下不展現。相比之下，當具有5' EcoR I-處理端及3' BamH I之消化的PCR產物接合至具有多個用EcoR I及BamH I消化之選殖位點之選殖載體時，將典型地展現方向接合。

【0062】如本文所使用之術語「經基因改造之細胞毒性細胞靶向之疾病」涵蓋本發明之經基因改造之細胞以任何方式標靶任何疾病中之任何相關細胞，與經基因改造之細胞是否靶向患病細胞或健康細胞以實現治療學上有利的結果無關。經基因改造之細胞包括(但不限於)經基因改造之T細胞、NK細胞及巨噬細胞。經基因改造之細胞表現本發明之CAR，該等CAR可靶向靶細胞表面上表現之抗原中之任一者。可靶向之抗原之實例包括(但不限於)B細胞上表現之抗原；癌瘤、肉瘤、淋巴瘤、白血病、生殖細胞腫瘤及母細胞瘤上表現之抗原；各種免疫細胞上表現之抗原；及與各種血液科疾病、自體免疫疾病及/或發炎疾病相關之細胞上表現之抗原。可靶向之其他抗原將為熟習此項技術者顯而易見，且關於其替代性實施例可藉由本發明之CAR靶向。

【0063】如本文所使用之術語「經基因改造之細胞」、「經重新導向之細胞」、「經基因工程改造之細胞」或「經改造之細胞」係指表現本發明之CAR之細胞。

【0064】術語「DNA改組」在本文中用於指示實質上同源但不相同

序列之間的再結合，在一些實施例中，DNA改組可涉及經由非同源重組交換，諸如經由cer/lox及/或flp/frt系統及其類似物。DNA改組可為隨機或非隨機的。

【0065】術語「藥物」或「藥物分子」係指包括當向人類或動物身體投與時對人類或動物身體具有有利作用之物質的治療劑。較佳地，治療劑包括可治療、治癒或緩解人類或動物身體之一或多個症狀、疾病或異常病況或增強人類或動物身體之健康的物質。

【0066】「有效量」為在一定時間段內能有效地治療或預防所投與之活有機體之病況，例如在所需給藥時間間隔期間提供治療效果之條件活性生物蛋白或片段之量。

【0067】如本文所使用之術語「電解質」定義帶有電荷之血液或其他體液中之礦物質。舉例而言，在一個態樣中，正常生理條件及異常條件可為「電解質濃度」之條件。在一個態樣中，待測試電解質濃度選自離子化鈣、鈉、鉀、鎂、氯離子、碳酸氫鹽及磷酸鹽濃度中之一或多者。舉例而言，在一個態樣中，血清鈣之正常範圍為8.5至10.2 mg/dL。在此態樣中，異常血清鈣濃度可選自高於或低於正常範圍，在另一實例中，在一個態樣中，血清氯離子之正常範圍為每公升96-106毫當量(mEq/L)。在此態樣中，異常血清氯離子濃度可選自高於或低於正常範圍，在另一實例中，在一個態樣中，血清鎂之正常範圍為1.7-2.2 mg/dL。在此態樣中，異常血清鎂濃度可選自高於或低於正常範圍，在另一實例中，在一個態樣中，血清磷之正常範圍為2.4至4.1 mg/dL。在此態樣中，異常血清磷濃度可選自高於或低於正常範圍。在另一實例中，在一個態樣中，血清或血液鈉之正常範圍為135至145 mEq/L。在此態樣中，異常血清或血液鈉濃度可選

自高於或低於正常範圍。在另一實例中，在一個態樣中，血清或血液鉀之正常範圍為3.7至5.2 mEq/L。在此態樣中，異常血清或血液鉀濃度可選自高於或低於正常範圍。在另一態樣中，血清碳酸氫鹽之正常範圍為20至29 mEq/L。在此態樣中，異常血清或血液碳酸氫鹽濃度可選自高於或低於正常範圍。在不同態樣中，碳酸氫鹽水準可用於指示血液中之酸度(pH)之正常水準。術語「電解質濃度」亦可用於定義除血液或血漿外組織或液體中之特定電解質之條件。在此情況下，正常生理條件視為彼組織或液體之臨床正常範圍。在此態樣中，異常組織或液體電解質濃度可選自高於或低於正常範圍。

【0068】如本文所使用之術語「抗原決定基」係指抗體，諸如酶特异性抗體之互補位所結合之抗原，諸如酶多肽上之抗原決定子。抗原決定子通常由分子，諸如胺基酸或糖側鏈之化學活性表面群組組成，且可具有特定三維結構特性以及荷質比特性。如本文所使用，「抗原決定基」係指能夠形成與抗體之可變區結合體相互作用之結合相互作用的抗原或其他大分子之部分。典型地，此類結合相互作用體現為與CDR之一或多個胺基酸殘基之分子間接觸。

【0069】如本文所使用，術語「進化(evolution)」或「進化(evolving)」係指使用一或多種突變誘發方法生成編碼新穎多肽之新穎聚核苷酸，該新穎多肽自身為改良生物學分子及/或有助於生成其他改良生物學分子。在特定非限制性態樣中，本發明係關於自親本或野生型蛋白質進化條件活性生物蛋白。在一個態樣中，舉例而言，進化係關於一種進行美國專利申請案公開案2009/0130718中所揭示之非隨機聚核苷酸嵌合及非隨機定點突變誘發之方法。更特定言之，本發明提供用於進化條件活性

生物酶之方法，其展現相比於親本或野生型酶母分子在正常生理條件下降低的活性，但相比於親本或野生型酶之抗原特異性靶向區在一或多個異常條件下增強的活性。

【0070】當指代參考多肽時，術語「片段」、「衍生物」及「類似物」包括保留與參考多肽至少基本上相同之至少一種生物功能或活性的多肽。此外，術語「片段」、「衍生物」或「類似物」藉由「前形式」分子例示，諸如可藉由裂解經改造以產生具有明顯更高活性之成熟酶之低活性前蛋白。

【0071】如本文所使用之術語「基因」意謂涉及產生多肽鏈之DNA鏈段；其包括在編碼區之前及之後的區域(前導序列及尾部序列)以及個別編碼鏈段(外顯子)之間的介入序列(內含子)。

【0072】如本文所使用之術語「異源」意謂一個單股核酸序列無法混雜至其他單股核酸序列或其互補序列中。因此，異源區域意謂聚核苷酸或聚核苷酸之區域在其序列內具有無法混雜至其他核酸或聚核苷酸中之區域或區。此類區或區域為例如突變區域。

【0073】如本文所使用之術語「同源(homologous)」或「同源(homeologous)」意謂一個單股核酸序列可混雜至互補單股核酸序列中。雜交程度可視多種因素而定，包括序列之間的一致性之量及雜交條件，諸如如稍後所論述之溫度及鹽濃度。較佳地，一致性區域超過約5 bp，更佳地，一致性區域超過10 bp。

【0074】本發明之益處延伸至「工業應用」(或工業處理)，該術語用於包括商業工業(或簡稱工業)中之應用以及非商業工業應用(例如非利益機構之生物醫學研究)。相關應用包括診斷、醫學、農業、製造及學術

領域中之彼等應用。

【0075】如本文所使用之術語「免疫細胞」係指哺乳動物免疫系統細胞，包括(但不限於)抗原呈遞細胞、B細胞、嗜鹼性球、細胞毒性T細胞、樹突狀細胞、嗜酸性球、粒細胞、輔助T細胞、白血球、淋巴細胞、巨噬細胞、肥大細胞、記憶細胞、單核球、自然殺手細胞、嗜中性白血球、吞噬細胞、漿細胞及T細胞。

【0076】如本文所使用之術語「免疫反應」係指免疫，包括(但不限於)先天性免疫、體液免疫、細胞免疫、免疫、發炎反應、獲得性(應變性)免疫、自體免疫及/或過度活化免疫。

【0077】如本文所使用之術語「經分離」意謂材料自其初始環境(例如天然環境，若其為天然存在的)移出。舉例而言，活動物中存在之天然存在的聚核苷酸或酶未分離，但分離自天然系統中之共存材料中之一些或全部分離的相同聚核苷酸或酶。此類聚核苷酸可為載體之部分及/或此類聚核苷酸或酶可為組合物之部分，且又經分離，因為此類載體或組合物不為其天然環境之部分。

【0078】如本文所使用之術語「經分離之核酸」定義不與5'及3'側接序列立即連續(當存在於衍生其之天然存在之生物體之基因組中時，其通常立即連續)之核酸，例如DNA或RNA分子。術語因此描述例如併入載體，諸如質體或病毒載體中之核酸；併入異源細胞基因組(或同源細胞基因組，但在與其天然存在之位點不同之位點處)中之核酸；及以單獨分子形式存在之核酸，例如藉由PCR擴增或限制酶消化產生之DNA片段或藉由活體外轉錄產生之RNA分子。術語亦描述重組核酸，其形成編碼可用於例如產生融合蛋白之額外多肽序列的混雜基因之部分。

【0079】如本文所使用之術語「慢病毒」係指反轉錄病毒科家族之屬。慢病毒為能夠感染未分裂細胞之反轉錄病毒中特有的；其可將大量遺傳資訊遞送至宿主細胞DNA中，如此其為遞送基因遞送載體之最有效方法中之一者。HIV、SIV及FIV均為慢病毒之實例。衍生自慢病毒之載體提供實現顯著水準之活體內基因轉移的手段。

【0080】如本文所使用之術語「配位體」係指分子，諸如藉由特定受體識別之隨機肽或可變鏈段序列。如熟習此項技術者將認識到，分子(或大分子複合物)可為受體及配位體兩者。一般而言，具有較小分子量之結合搭配物稱為配位體且具有較大分子量之結合搭配物稱為受體。

【0081】如本文所使用之術語「接合」係指在兩個雙股核酸片段之間形成磷酸二酯鍵之方法(Sambrook等人, (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., p. 146 ; Sambrook等人, *Molecular Cloning: a laboratory manual*,第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。除非另外提供，否則可使用已知緩衝劑及條件實現接合，利用每0.5微克約等莫耳量之待接合DNA片段10個單位之T4 DNA連接酶(「連接酶」)。

【0082】如本文所使用之術語「連接子」或「間隔子」係指分子或連接兩個分子之分子組，諸如DNA結合蛋白及隨機肽，且用以將兩個分子置放在較佳結構中，例如以使得隨機肽可以來自DNA結合蛋白之最小位阻結合至受體。如本文所使用之「連接子」(L)或「連接子域」或「連接子區域」係指約1至100個胺基酸長之寡或多肽區域，其將本發明之CAR之域/區中之任一者連接在一起。連接子可由可撓性殘基，如甘胺酸及絲胺酸構成，使得相鄰蛋白域相對於彼此自由移動。當需要確保兩個相

鄰域不會在空間上彼此干擾時，可使用較長連接子。連接子可為可裂解或不可裂解的。可裂解連接子之實例包括2A連接子(例如T2A)、2A樣連接子或其功能等效物及其組合。在一些實施例中，連接子包括：小核糖核酸病毒2A樣連接子；豬捷申病毒屬(P2A)、明脈扁刺蛾(*Thomomys asiana*)病毒(T2A)之CHYSEL序列或其組合、變體及功能等效物。其他連接子將對熟習此項技術者而言為顯而易見的，且可與本發明之替代性實施例結合使用。

【0083】如本文所使用之術語「哺乳動物細胞表面呈現」係指出於篩選目的蛋白質或抗體或抗體之一部分藉此表現及呈現於哺乳動物宿主細胞表面上之技術；舉例而言，藉由磁珠及螢光活化細胞分選之組合篩選特異性抗原結合。在一個態樣中，哺乳動物表現載體用於同時表現免疫球蛋白為分泌性及細胞表面結合形式兩者，如在DuBridge等人，US 2009/0136950中。在另一態樣中，採用該等技術以篩選編碼在細胞中表現時細胞膜之呈現之抗體或抗體片段庫之病毒載體，如在Gao等人，US 2007/0111260中。哺乳動物細胞上之完整IgG表面呈現為已知的。舉例而言，Akamatsu等人研發適用於基於其抗原結合親和力及生物活性而直接分離IgG分子之哺乳動物細胞表面呈現載體。使用艾伯斯坦-巴爾病毒源游離型載體，抗體庫呈現為細胞表面上之完整IgG分子且藉由磁珠及螢光活化細胞分選之組合篩選特異性抗原結合。自分選的細胞回收編碼具有所需結合特性之抗體之質體且轉化成適用於產生可溶性IgG之形式。參見Akamatsu等人 *J. Immunol. Methods*, 第327卷, 第40頁至第52頁, 2007。Ho等人使用廣泛用於暫時性蛋白質表現之人類胚胎腎293T細胞來細胞表面呈現親和力成熟之單鏈Fv抗體。以更高親和力表現稀少突變型抗體之細

胞藉由自大量以略微更低親和力表現WT抗體之細胞單程細胞分選來增濃240倍。此外，在單次選擇使固有抗體熱點隨機化之組合庫之後以對CD22提高的結合親和力獲得高度增濃突變體。參見Ho等人，「Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells」, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 第103卷,第9637頁至第9642頁, 2006。

【0084】亦可使用對抗原具有特異性的B細胞。此類B細胞可直接自人類供體之周邊血液單核細胞(PBMC)分離。由此B細胞池產生重組抗原特異性單鏈Fv (scFv)庫且藉由使用辛得比斯病毒(Sindbis virus)表現系統藉由哺乳動物細胞表面呈現進行篩選。重鏈(HC)及輕鏈(LC)之可變區(VR)可自陽性純系分離且重組全人類抗體產生為完整IgG或Fab片段。以此方式，可分離結合Q β 病毒樣粒子(VLP)、模型病毒抗原之若干超突變高親和力抗體以及對菸鹼具有特異性的抗體。參見Beerli等人，「Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display」, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 第105卷,第14336頁至第14341頁, 2008。

【0085】酵母細胞表面呈現亦可用於本發明中，例如參見Kondo及Ueda，「Yeast cell-surface display-applications of molecular display」, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 第64卷,第28頁至第40頁, 2004，其描述例如使用酵母啤酒酵母菌之細胞表面工程改造系統。用於在酵母釀酒酵母中表現之若干代表性呈現系統描述於Lee等人，「Microbial cell-surface display」, *TRENDS in Biotechnol.*,第21卷,第45頁至第52頁, 2003中。亦Boder及Wittrup，「Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries」, *Nature Biotechnol.*,第15卷,第553頁, 1997。

【0086】如本文所使用之術語「製造」係指以足夠數量產生蛋白質

以准許治療蛋白之至少階段I臨床測試或診斷蛋白質之調節批准之足夠數量。

【0087】如本文所使用，術語「微環境」意謂相比於組織之其他區或身體之其他區具有恆定或暫時物理或化學差異之組織或身體之任何部分或區域。

【0088】如本文所使用，術語「待進化分子特性」包括指代包括聚核苷酸序列之分子、包括多肽序列之分子及包括於聚核苷酸序列部分中及多肽序列部分中之分子。待進化分子特性之尤其相關(但決非限制性)實例包括在指定條件下之蛋白質活性，諸如與溫度；鹽度；滲透壓；pH；氧化壓力及反應環境中接觸到之甘油、DMSO、清潔劑及/或任何其他分子物質之濃度相關。待進化分子特性之額外尤其(但決非限制性)實例包括穩定性，例如在於指定環境之指定曝露時間之後存在的殘餘分子特性之量，諸如可能在儲存期間遇到。

【0089】如本文所使用之術語「突變」意謂親本序列或野生型核酸序列之變化或肽序列之變化。此類突變可為點突變，諸如過渡或顛換。突變可為缺失、插入或複製。

【0090】如本文所使用之術語「多特異性抗體」為對至少兩種不同抗原決定基具有結合親和力之抗體。多特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段(例如F(ab')₂雙特異性抗體)。經工程改造之抗體可結合至兩種、三種或多於三種(例如四種)抗原(參見例如US 2002/0004587 A1)。一種條件活性抗體可經工程改造為多特異性的，或兩種抗體可經工程改造以包括結合至兩種抗原之雜二聚體。多特異性抗體亦可為多官能性的。

【0091】如本文所使用，簡併「N、N、G/T」核苷酸序列表示32種

可能的三重峰，其中「N」可為A、C、G或T。

【0092】如本文所使用之術語「天然存在的」在應用於對象時係指可在自然界中發現對象之事實。舉例而言，可自自然界中之來源中分離且尚未在實驗室中有意地由人改造之生物體(包括病毒)中所存在之多肽或聚核苷酸序列為天然存在的。一般而言，術語天然存在的係指非病理學(未患病)個體中存在之對象，諸如對於物質將為典型的。

【0093】如本文所使用，「正常生理條件」或「野生型操作條件」為溫度、pH、滲透壓、重量莫耳滲透濃度、氧化壓力及電解質濃度之彼等條件，其將考慮在個體之投與位點或作用位點處在正常範圍內。

【0094】如本文所使用，術語「核酸分子」包括至少一個鹼或一個鹼基對，視其是否分別為單股或雙股而定。此外，核酸分子可排他性地或嵌合地屬於含有核苷酸之分子之任何群組，如以下核酸分子群組所例示(但不限於)：RNA、DNA、基因組核酸、非基因組核酸、天然存在及非天然存在之核酸及合成核酸。藉助於非限制性實例，此包括與任何細胞器，諸如粒線體相關之核酸、核糖體RNA及嵌合地包括一種或多種不與天然存在之組分天然存在於一起之組分的核酸分子。

【0095】另外，「核酸分子」可部分地含有一或多個非核苷酸基組分，如胺基酸及糖所例示(但不限於)胺基酸及糖。因此，藉助於實例(但非限制性)，部分地核苷酸基及部分地蛋白質基核糖核酸酶視為「核酸分子」。

【0096】如本文所使用之術語「編碼……之核酸序列」或「……之DNA編碼序列」或「編碼……之核苷酸序列」係指當處於適當的調節序列，諸如啟動子控制下時經轉錄及轉譯成酶之DNA序列。「促進劑」為能

夠結合細胞中之RNA聚合酶及引發下游(3'方向)編碼序列之轉錄的DNA調節區。啟動子為DNA序列之部分。此序列區域在其3'末端具有起始密碼子。啟動子序列確實包括最小數目之鹼基，其中引發轉錄所必要的元件在可偵測高於背景之水準下。然而，在RNA聚合酶結合序列且轉錄在起始密碼子(具有啟動子之3'末端)開始之後，在3'方向上下游進行轉錄。在啟動子序列將發現負責RNA聚合酶結合之轉錄起始位點(適宜地由核酸酶S1映射定義)以及蛋白質結合域(共有序列)內。

【0097】術語「寡核苷酸」(或同義「寡聚」)係指可化學合成之單股聚去氧核苷酸或兩個互補聚去氧核苷酸股。此類合成寡核苷酸可或可不具有5'磷酸鹽。在激酶存在下未添加磷酸鹽與ATP之情況下，不具有5'磷酸鹽之彼等者將不連接至其他寡核苷酸。合成寡核苷酸將連接至尚未去磷酸化之片段。

【0098】如本文所使用，術語「可操作地連接」係指功能關係中之聚核苷酸元件之鍵聯。核酸在其置放至與另一核酸序列具有功能關係時「可操作地連接」。舉例而言，若啟動子或增強子影響編碼序列之轉錄，則其可操作地連接至該編碼序列。可操作地連接意謂所連接之DNA序列典型地為連續的且必要時接合兩個連續且在閱讀框架中之蛋白質編碼區。

【0099】當RNA聚合酶將轉錄兩個編碼序列成單一mRNA時，編碼序列「可操作地連接至」其他編碼序列，其隨後轉譯成具有衍生自兩種編碼序列之胺基酸之單一多肽。編碼序列無需彼此連續，只要最終處理表現序列以產生所需蛋白質即可。

【0100】如本文所使用，術語「親本聚核苷酸組」為包括一或多種不同聚核苷酸物質之組。通常此術語用於指代較佳藉由親本組之誘變獲得

之後代聚核苷酸組，在此情況下，術語「親本」、「起始」及「模板」可互換使用。

【0101】術語「患者」或「個體」係指為治療對象之動物，例如哺乳動物，諸如人類。個體或患者可為男性或女性。

【0102】如本文所使用，術語「生理條件」係指溫度、pH、滲透壓、離子強度、黏度及類似生物化學參數，其與可存活生物體相容及/或其典型地胞內存在於可存活培養酵母細胞或哺乳動物細胞中。舉例而言，在典型的實驗室培養條件下生長之酵母細胞中之細胞內條件為生理條件。活體外轉錄混合液之適合的活體外反應條件為一般生理條件。一般而言，活體外生理條件包括50-200 mM NaCl或KCl，pH 6.5-8.5，20-45°C 及0.001-10 mM二價陽離子(例如 Mg^{++} 、 Ca^{++})；較佳約150 mM NaCl或KCl，pH 7.2-7.6，5 mM二價陽離子，且通常包括0.01-1.0百分比非特異性蛋白質(例如牛血清白蛋白(BSA))。非離子型清潔劑(Tween，NP-40，Triton X-100)可經常存在，通常在約0.001至2%，典型地0.05-0.2% (v/v)下。醫師可根據習知方法選擇特定水性條件。出於一般指導，以下緩衝水性條件可為適用的：10-250 mM NaCl，5-50 mM Tris HCl，pH5-8，視情況添加二價陽離子及/或金屬螯合劑及/或非離子型洗滌劑及/或膜溶離份及/或消泡劑及/或閃爍體。正常生理條件係指在投與位點或作用位點處活體內患者或個體中之溫度、pH、滲透壓、重量莫耳滲透濃度、氧化壓力及電解質濃度之條件，其將考慮在患者之正常範圍內。

【0103】標準公約(5'至3')在本文中用於描述雙股聚核苷酸之序列。

【0104】如本文所使用之術語「群體」意謂一批組分，諸如聚核苷酸、部分或聚核苷酸或蛋白質。「混合群體」意謂屬於相同核酸或蛋白質

家族(亦即，相關)之一批組分，但其不同之處在於其序列(亦即，不相同)及因此其生物活性。

【0105】具有「前形式」之分子係指在途中經受一或多種共價及非共價化學修飾(例如糖基化、蛋白水解裂解、二聚或低聚、溫度誘發或pH誘發之構形改變、與輔因子相關聯等)之任何組合之分子以獲得相較於參考前形式分子具有特性差異(例如活性提高)之更成熟分子形式。當可在途中區分兩種或多於兩種化學修飾(例如兩種蛋白水解分裂或蛋白水解裂解及去糖基化)以產生成熟分子時，參考前驅體分子可稱為「預前形式」分子。

【0106】如本文所使用，術語「受體」係指對給定配位體具有親和力之分子。受體可為天然存在或合成分子。可在未改變狀態下或以與其他物質之聚集物形式採用受體。受體可直接或經由特異性結合物質共價或非共價附著至結合成員。受體之實例包括(但不限於)抗體，包括單株抗體及可與特異性抗原決定子(諸如在病毒、細胞或其他材料上)反應之抗血清、細胞膜受體、複合物碳水化合物及醣蛋白、酶及激素受體。

【0107】如本文所使用，術語「減少重排」係指經由重複序列介導之缺失(及/或插入)事件產生之分子多樣性提高。

【0108】如本文所使用之術語「限制位點」係指顯現限制酶作用所必需之識別序列，且包括催化裂解位點。應瞭解，裂解位點可或可不含於包括低模糊度序列(亦即，含有限制位點之出現頻率之主要決定子之序列)之限制位點之一部分內。當酶(例如限制酶)稱為「裂解」聚核苷酸時，應理解意謂限制酶催化或促進聚核苷酸裂解。

【0109】如本文所使用，術語「單鏈抗體」係指在一般經由間隔子

肽連接之多肽鏈中包括VH域及VL域之多肽，且其可在胺基及/或羧基末端處包括額外胺基酸序列。舉例而言，單鏈抗體可包括用於連接至編碼聚核苷酸的繫鏈鏈段。作為一實例，scFv為單鏈抗體。單鏈抗體一般為由一或多個實質上由免疫球蛋白超家族基因編碼之至少10個連續胺基之多肽鏈段組成之蛋白質(例如參見The Immunoglobulin Gene Superfamily, A. F. Williams及A. N. Barclay, in Immunoglobulin Genes, T. Honjo, F. W. Alt, 及THE. Rabbits編, (1989) Academic press: San Diego, Calif., 第361頁至第368頁，最常由啮齒動物、非人類靈長類動物、禽類、豬科動物、牛科動物、綿羊科動物、山羊或人類重鏈或輕鏈基因序列編碼。功能性單鏈抗體一般含有免疫球蛋白超家族基因產物之足夠部分，以便保留結合至特異性靶分子的特性，特異性靶分子通常為受體或抗原(抗原決定基)。

【0110】若分子對之成員以相比於其他非特異性分子更大親和力彼此結合，則分子對之成員(例如抗體-抗原對及配位體-受體對)稱為彼此「特異性結合」。舉例而言，相比於非特異性蛋白質更有效地結合抗原之升高之抗體可描述為特異性結合至抗原。

【0111】如本文所使用之術語「刺激」係指由刺激分子(例如TCR/CD3複合物)與其同源配位體之結合誘發的初級反應，藉此介導信號轉導事件，諸如(但不限於)經由TCR/CD3複合物進行信號轉導。刺激可介導某些分子之改變表現，諸如下調TGF- β ，及/或重組細胞骨架結構，及其類似者。

【0112】如本文所使用之術語「刺激分子」意謂與存在於抗原呈遞細胞上之同源刺激配位體特異性結合之T細胞上的分子。

【0113】如本文所使用之術語「刺激配位體」意謂當存在於抗原呈

遞細胞(例如樹突狀細胞、B細胞及其類似者)上時配位體可與T細胞上之同源結合搭配物(在本文中稱為「刺激分子」)特異性結合，藉此藉由T細胞介導初級反應，包括(但不限於)活化、免疫反應起始、增殖及其類似者。刺激配位體為此項技術中熟知的且尤其涵蓋裝載有肽、抗CD3抗體、超促效劑CD28抗體及超促效劑抗CD2抗體之MHC I類分子。

【0114】如本文所使用之術語「靶細胞」係指疾病中涉及之細胞且可藉由本發明之經基因改造之細胞毒性細胞(包括(但不限於)經基因改造之T細胞、NK細胞及巨噬細胞)靶向。其他靶細胞將對熟習此項技術者而言為顯而易見的，且可與本發明之替代性實施例結合使用。

【0115】術語「T細胞」及「T淋巴球」在本文中可互換且同義使用。實例包括(但不限於)原始T細胞、中樞記憶T細胞、效應記憶T細胞及其組合。

【0116】如本文所使用之術語「轉導」係指使用病毒載體將外源核酸引入至細胞中。如本文所使用之「轉染」係指使用重組DNA技術將外源核酸引入至細胞中。術語「轉化」意謂將「外源」(亦即，外源性或細胞外)基因、DNA或RNA序列引入至宿主細胞中，以使得宿主細胞將表現引入的基因或序列以產生所需物質，諸如引入的基因或序列所編碼之蛋白質或酶。引入的基因或序列亦可稱作「選殖」或「外源」基因或序列，可包括調節或控制序列，諸如供細胞基因機制使用之起始、中止、啟動子、信號、分泌或其他序列。基因或序列可包括非功能性序列或不具有已知功能之序列。接受且表現引入的DNA或RNA之宿主細胞已「轉化」且為「轉型體」或「殖株」。引入至宿主細胞中之DNA或RNA可來自任何來源，包括與宿主細胞相同屬或物種之細胞或不同屬或物種之細胞。

【0117】術語「治療」包括：(1)預防或延遲在可能罹患或易患病狀、病症或病況但尚未經歷或呈現該病狀、病症或病況之臨床或亞臨床症狀之動物(尤其為哺乳動物且尤其為人類)中顯現的病狀、病症或病況之臨床症狀之出現；(2)抑制該病狀、病症或病況(例如阻滯、減小或延遲該疾病之發展或其復發(在維持治療的情況下)或其至少一種臨床或亞臨床症狀)；及/或(3)減輕病況(亦即導致病狀、病症或病況或其臨床或亞臨床症狀中之至少一者之消退)。對所治療之患者的益處在統計上顯著或至少可被患者或被醫師察覺。

【0118】如本文所使用，「腫瘤」係指所有瘤性細胞生長及增生(無論惡性或良性)，及所有癌前及癌細胞及組織。

【0119】如本文所使用，術語「腫瘤微環境」係指腫瘤環境之任何及所有元素，包括產生用於惡性進程存活及/或擴展及/或擴散之結構性及或功能性環境的元素。

【0120】如本文所使用，術語「可變鏈段」係指包括隨機、偽隨機或限定核心序列之新生肽之一部分。「可變鏈段」係指包括隨機、偽隨機或限定核心序列之新生肽之一部分。可變鏈段可包括變異及不變殘基位置兩者，且變異殘基位置處殘基變化程度可能有限：兩種選項由醫師酌情選擇。典型地，可變鏈段為約5至20個胺基酸殘基長(例如8至10)，但可變鏈段可更長且可包括抗體部分或受體蛋白，諸如抗體片段、核酸結合蛋白、受體蛋白及其類似物。

【0121】如本文所使用之「載體」、「選殖載體」及「表現載體」係指媒劑，可藉由其將聚核苷酸序列(例如外源基因)引入至宿主細胞中，以便轉化宿主且促進引入的序列之表現(例如轉錄及轉譯)。載體包括質體、

噬菌體、病毒等。

【0122】如本文所使用，術語「野生型」意謂聚核苷酸不包括任何突變。「野生型蛋白質(wild type protein)」、「野生型蛋白質(wild-type protein)」、「野生型生物蛋白(wild-type biologic protein)」或「野生型生物蛋白(wild type biologic protein)」係指可自自然界分離之蛋白質，其以自然界中發現之活性水準將為活性的，且將包括自然界中發現之胺基酸序列。術語「母分子」及「靶蛋白」亦指野生型蛋白質。「野生型蛋白質」較佳具有一些所需特性，諸如更高結合親和力或酶活性，其可藉由篩選蛋白質庫之所需特性獲得，包括在不同溫度或pH環境中之更佳穩定性或改良的選擇性及/或溶解度。

【0123】舉例而言，如在「加工樣品」中之術語「加工」簡單地為藉由加工之樣品。同樣地，例如「加工分子」為藉由加工之分子。

【0124】出於說明之目的，藉由參考各種例示性實施例來描述本發明之原理。儘管在本文中具體描述本發明之某些實施例，但一般熟習此項技術者將易於認識到相同原理同樣適用於且可用於其他系統及方法中。在詳細解釋本發明所揭示之實施例之前，應理解，本發明不將其應用限制於所顯示之任何特定實施例之細節。另外，本文所使用之術語係出於描述而非限制之目的。此外，儘管參考以一定次序呈現於本文中之步驟來描述某些方法，但在許多情況下，可按可為熟習此項技術者理解之任何次序進行此等步驟；新穎方法因此不限於本文中所揭示之特定步驟安排。

【0125】必須注意，除非上下文另外明確說明，否則如本文及隨附申請專利範圍所用之單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個參考

物。此外，術語「一(a或an)」、「一或多個(種)」及「至少一個(種)」在本文中可互換使用。術語「包含」、「包括」、「具有」及「建構自」亦可互換使用。

【0126】 本發明係關於一種用於與靶抗原結合之嵌合抗原受體(CAR)，其包含至少一個自親本或野生型蛋白質或其域進化且相比於在異常條件下分析中之活性，在正常生理條件下分析中之活性降低的抗原特異性靶向區；跨膜域；及細胞內信號傳導域。在一些實施例中，嵌合抗原受體進一步包括細胞外間隔子域或至少一個協同刺激域。靶抗原可為腫瘤特異性抗原，其可為Ax1、ROR2或CD22。

【0127】 本發明之CAR可具有以下中之至少一者：(1)其對靶抗原之親和力在正常生理條件下可逆地或不可逆地降低，及(2)相較於不具有條件活性抗原特異性靶向區之相同CAR提高的親和力。此等CAR可將細胞毒性細胞引導至存在異常病況之疾病位點，諸如腫瘤微環境或滑液。由於此等特性，同時歸因於其對正常組織之低親和力CAR可優先將細胞毒性細胞引導至疾病位點。此類CAR可顯著降低副作用且允許更高劑量之治療劑以用於提高治療功效。CAR對於研發在個體內持續較短或有限時間段所需要之新穎治療劑為尤其有價值的。有利的應用之實例包括高劑量之全身性治療以及高濃度之局部治療。

【0128】 嵌合抗原受體可包括相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區，在正常生理條件下對靶抗原之結合親和力降低之抗原特異性靶向區。

【0129】 嵌合抗原受體多數包括相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區在異常條件下分析中之活性提高且相比於親本或野生

型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區在正常生理條件下對靶抗原之結合親和力降低的抗原特異性靶向區。

【0130】在前述嵌合抗原受體中之任一者中，相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區，抗原特異性靶向區在異常條件下分析中之選擇性亦可提高。

【0131】在一些實施例中，抗原特異性靶向區可具有至少約1.1，或至少約1.2，或至少約1.4，或至少約1.6，或至少約1.8，或至少約2，或至少約2.5，或至少約3，或至少約5，或至少約7，或至少約8，或至少約9，或至少約10，或至少約15，或至少約20之異常條件中之活性與正常生理條件中之相同活性之比率。

【0132】CAR分子包括連接兩個抗原特異性靶向區之連接子(圖1)。連接子以使得CAR-T細胞上之兩個抗原特異性靶向區展現結合至靶抗原之改良或最優活性的方式使兩個抗原特異性靶向區定向(Jensen等人, 「Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells」, *Immunol Rev.*, 第257卷, 第127頁至第144頁, 2014)。連接子因此較佳能夠採用特異性構形，其實現兩個抗原特異性靶向區對靶抗原之改良或最優結合，藉此提高CAR-T細胞效果。

【0133】在一些實施例中，連接子可為Gly-Ser縱排重複序列，其長度為18-25個胺基酸(Grada, 「TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy」, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 第2卷, e105, 2013)。此可撓性連接子能夠採用多種不同構形以便於結合至靶抗原之兩個抗原特異性靶向區之改良或最優表現。

【0134】在一些實施例中，連接子能夠在正常生理條件及異常條件

下採用不同構形。特定言之，連接子在異常條件下具有第一構形，其對於呈遞兩個抗原特異性靶向區結合至靶抗原而言為改良或最優的，而相同連接子在正常生理條件下具有第二構形，其與在異常條件下連接子之第一構形相比，呈遞兩個抗原特異性靶向區結合至靶抗原之效果較差。此類連接子可稱作「條件性連接子」，其與在正常生理條件下相比，允許兩個抗原特異性靶向區在異常條件下以更高結合活性結合至靶抗原。因此，與在正常生理條件下之相同CAR-T細胞相比，包括此類條件性連接子之CAR-T細胞在異常條件下之活性更高。

【0135】先前例如在Di Russo等人(「pH-Dependent conformational changes in proteins and their effect on experimental pK(a)s: the case of Nitrophorin 4」, *PLoS Comput Biol.*, 第8卷, e1002761, 2012)中已描述在不同pH下改變構形之蛋白質。另外，在不同溫度下具有不同構形之蛋白質已描述於Caldwell, 「Temperature-induced protein conformational changes in barley root plasma membrane-enriched microsomes」, *Plant Physiol.*, 第84卷, pp. 924-929, 1989中。受pH及/或溫度影響之抗體之構形已論述於Gandhi, 「Effect of pH and temperature on conformational changes of a humanized monoclonal antibody」, 美國羅德島大學之碩士論文(Master's thesis from University of Rhode Island, U.S.)中。

【0136】選擇用於CAR分子中之條件性連接子在本發明之範疇內。條件性連接子可在異常條件下採用第一構形，其對於呈遞兩個抗原特異性靶向區結合至靶抗原而言為改良或最優的，且在正常生理條件下採用第二構形，其對於呈遞兩個抗原特異性靶向區結合至靶抗原而言為次最佳的。在一些實施例中，在正常生理條件下連接子之次最佳構形產生對靶抗原之

結合活性為在異常條件下具有改良或最優連接子構形之CAR分子之結合活性的小於約90%，或約80%，或約70%，或約60%，或約50%，或約40%，或約30%，或約20%，或約10%，或約5%之CAR分子。

【0137】條件性連接子可由選自2A連接子、2A樣連接子、小核糖核酸病毒2A樣連接子、豬科動物捷申病毒屬之2A肽(P2A)及明脈扁刺蛾病毒(T2A)之2A肽以及其變體及功能等效物之起始連接子產生。起始連接子進化以產生突變蛋白質；突變蛋白質隨後經受在正常生理條件下之分析及在異常條件下之分析。具有條件性連接子之蛋白質基於以下選自突變蛋白質，所選蛋白質展現(a)在異常條件下具有第一構形之條件性連接子，其對於呈遞兩個抗原特異性靶向區結合至靶抗原而言為改良或最優的，及(b)在正常生理條件下第二構形之條件性連接子，其對於呈遞兩個抗原特異性靶向區結合至靶抗原而言為次最佳的。

【0138】CAR分子亦包括將兩個抗原特異性靶向區與跨膜域連接，其又連接至協同刺激域及T細胞內部之細胞內信號傳導域之細胞外間隔子域(圖1)。細胞外間隔子域較佳能夠支持抗原特異性靶向區識別且結合至靶細胞上之靶抗原(Hudecek等人，「The non-signaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for *in vivo* antitumor activity」，*Cancer Immunol Res.*,第3卷,第125頁至第135頁, 2015)。在一些實施例中，細胞外間隔子域為可撓性域，因此使得抗原特異性靶向區具有最佳識別特異性結構及諸如腫瘤細胞之細胞上靶抗原之密度的結構(Hudecek等人，「The non-signaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for *in vivo* antitumor activity」，*Cancer Immunol Res.*,第3卷,第125頁至第135頁, 2015)。細胞

外間隔子域之可撓性准許細胞外間隔子域採用多種不同構形。

【0139】在一些實施例中，細胞外間隔子域能夠在正常生理條件及異常條件下採用不同構形。特定言之，細胞外間隔子域在異常條件下具有第一構形，其對於呈遞兩個抗原特異性靶向區結合至靶抗原而言為改良或最優的，而相同細胞外間隔子域在正常生理條件下具有第二構形，其對於呈遞兩個抗原特異性靶向區結合至靶抗原而言為次最佳的。此類細胞外間隔子域可稱作「條件性細胞外間隔子域」，因為其使得兩個抗原特異性靶向區能夠相比於在正常生理條件下以更高結合活性在異常條件下結合至靶抗原。因此，在條件性細胞外間隔子域之情況下，相比於在正常生理條件下之相同CAR-T細胞，CAR-T細胞在異常條件下之活性可更高。

【0140】選擇用於CAR分子中之條件性細胞外間隔子域在本發明之範疇內。在一些實施例中，在正常生理條件下細胞外間隔子域之次最佳構形產生對靶抗原之結合活性為在異常條件下具有相同細胞外間隔子域之最優構形之CAR分子的小於約90%，或約80%，或約70%，或約60%，或約50%，或約40%，或約30%，或約20%，或約10%，或約5%之CAR分子。

【0141】已發現，包括細胞外間隔子域及跨膜域之區域之泛素化抗性形式可增強CAR-T細胞信號傳導且因此強化抗腫瘤活性(Kunii等人, 「Enhanced function of redirected human t cells expressing linker for activation of t cells that is resistant to ubiquitylation」, *Human Gene Therapy*, 第24卷, 第27頁至第37頁, 2013)。在此區域內，細胞外間隔子域在CAR-T細胞外部，且因此曝露於不同條件且可潛在地成為條件泛素化抗性。

【0142】細胞外間隔子域條件泛素化抗性在本發明之範疇內。特定

言之，相比於在正常生理條件下，CAR分子之細胞外間隔子域在異常條件下之泛素化抗性更高。因此，具有條件泛素化抗性細胞外間隔子域之CAR-T細胞相對於其在正常生理條件下之細胞毒性將在異常條件下具有增強的細胞毒性。

【0143】條件泛素化抗性細胞外間隔子域可經選擇以在異常pH或異常溫度下泛素化抗性更高且在正常生理pH或正常生理溫度下泛素化抗性更低。在一個實施例中，條件泛素化抗性細胞外間隔子域在腫瘤微環境之pH下泛素化抗性更高，且在正常生理pH，諸如pH 7.2-7.6之人類血漿中之pH下泛素化抗性更低。

【0144】為了產生條件性細胞外間隔子域，選自抗體之Fc片段、抗體之鉸鏈區、抗體之CH2區及抗體之CH3區的起始蛋白質片段進化以產生突變蛋白質。突變蛋白質經受在正常生理條件下之分析及在異常條件下之分析。條件性細胞外間隔子域選自展現以下之突變蛋白質：(a)條件性細胞外間隔子域，其在異常條件下具有第一構形以便抗原特異性靶向區以更高結合活性結合至靶抗原且在正常生理條件下具有條件性細胞外結合域之第二構形以便抗原特異性靶向區以相比於在異常條件下更低結合活性結合至靶抗原；或(b)相比於在正常生理條件下，在異常條件下泛素化抗性更高的蛋白質。

【0145】前述嵌合抗原受體中之任一者可經組態以使得含有抗原受體之蛋白質相比於親本或野生型蛋白質或其域表現量提高。

【0146】在替代性實施例中，本發明提供一種用於與靶抗原結合之嵌合抗原受體(CAR)，其包括至少一個自親本或野生型蛋白質或其域進化且相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區，在異常條件下

分析中之選擇性提高的抗原特異性靶向區；跨膜域；及細胞內信號傳導域。在一些實施例中，嵌合抗原受體進一步包括細胞外間隔子域或至少一個協同刺激域。

【0147】本發明亦關於進化親本或野生型蛋白質或其域以產生具有以下中之至少一者之條件活性蛋白之方法：(a)相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區，在正常生理條件下分析中之活性降低，及(b)相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區，在異常條件下分析中之活性提高。條件活性蛋白可經工程改造至CAR中。

【0148】藉由該方法產生之嵌合抗原受體可包括相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區在正常生理條件下對靶抗原之結合親和力降低的抗原特異性靶向區。

【0149】藉由該方法產生之嵌合抗原受體可包括相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區在異常條件下分析中之活性提高且相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區在正常生理條件下對靶抗原之結合親和力降低的抗原特異性靶向區。

【0150】在藉由該方法產生之前述嵌合抗原受體中之任一者中，相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區，抗原特異性靶向區在異常條件下分析中之選擇性亦可提高。

【0151】藉由該方法產生之前述嵌合抗原受體中之任一者可經組態以使得含有抗原受體之蛋白質相比於親本或野生型蛋白質或其域表現量提高。

【0152】在該方法之替代性實施例中，用於與靶抗原結合之藉由該方法產生之嵌合抗原受體(CAR)包括：至少一個自親本或野生型蛋白質或

其域進化且相比於親本或野生型蛋白質或其域之抗原特異性靶向區在異常條件下分析中之選擇性提高的抗原特異性靶向區；跨膜域；及細胞內信號傳導域。在一些實施例中，嵌合抗原受體進一步包括細胞外間隔子域或至少一個協同刺激域。

嵌合抗原受體

【0153】哺乳動物，尤其人類之免疫系統具有靶向且破壞患病組織及/或病原體之細胞毒性細胞。使用此等細胞毒性細胞以移除諸如腫瘤之非所需組織(亦即，靶組織)為有前景的治療途徑。可靶向移除之其他組織包括腺體(例如前列腺)增生、疣及非所需脂肪組織。然而，此相對新穎治療途徑迄今為止僅達成有限成功。舉例而言，使用T細胞來靶向且破壞腫瘤具有相對較低長期益處，因為癌細胞可藉由減少表面抗原表現來適應新穎療法，從而降低此療法之效果。癌細胞甚至可去分化以逃避響應於腫瘤特異性T細胞之偵測。參見Maher, 「Immunotherapy of Malignant Disease Using Chimeric Antigen Receptor Engrafted T Cells」, *ISRN Oncology*, 第2012卷, 文章ID 278093, 2012。

【0154】表現嵌合抗原受體之細胞毒性細胞可明顯地增進此等細胞毒性細胞之特異性及靈敏度。舉例而言，表現CAR之T細胞(CAR-T細胞)能夠使用CAR來引導T細胞靶向表現特異性結合至CAR之細胞表面抗原之腫瘤細胞。此類CAR-T細胞可更加選擇性地將細胞毒性劑遞送至腫瘤細胞。CAR-T細胞可直接識別靶分子且因此典型地不受諸如人類白血球抗原(HLA)之多形性呈遞元件限制。此CAR靶向策略之優點有三重。第一，因為CAR-T細胞功能不視HLA狀態而定，基於相同CAR之途徑原則上可用於表現相同靶表面抗原之所有腫瘤患者。第二，抗原處理及呈遞機制之

損壞為腫瘤細胞之常見屬性且可促進免疫逃避。然而，此不會對CAR-T細胞提供保護。第三，可使用此系統靶向一系列大分子，包括蛋白質、碳水化合物及糖脂。

【0155】本發明之嵌合抗原受體為包括至少一個抗原特異性靶向區(ASTR)、跨膜域(TM)及細胞內信號傳導域(ISD)之嵌合人造蛋白。在一些實施例中，CAR可進一步包括細胞外間隔子域(ESD)及/或協同刺激域(CSD)。參見圖1。

【0156】ASTR為用於結合至包括蛋白質、碳水化合物及糖脂之特異性靶抗原之CAR的細胞外區。在一些實施例中，ASTR包括抗體，尤其單鏈抗體或其片段。ASTR可包括全長重鏈、Fab片段、單鏈Fv (scFv)片段、二價單鏈抗體或雙功能抗體，其中之每一者對靶抗原具有特異性。

【0157】ASTR亦可包括其他蛋白質功能域以識別且結合至靶抗原。因為靶抗原可具有其他生物學功能，諸如充當受體或配位體，ASTR可替代地包括用於與抗原特異性結合之功能域。具有功能域之蛋白質之一些實例包括聯結細胞介素(其使得能夠識別帶有細胞介素受體之細胞)、親和體、來自天然存在之受體之配位體結合域、用於受體，例如在腫瘤細胞上之可溶性蛋白質/肽配位體。實際上，能夠以高親和力結合至給定抗原之幾乎任何分子均可用於ASTR中，如熟習此項技術者將瞭解。

【0158】在一個實施例中，本發明之CAR包括至少兩種ASTR，其靶向至少兩種不同抗原或相同抗原上之兩種抗原決定基。在一個實施例中，CAR包括三種或多於三種靶向至少三種或多於三種不同抗原或抗原決定基之ASTR。當複數種ASTR存在於CAR中時，ASTR可以串聯方式經配置且可藉由連接肽分離(圖1)。

【0159】在一個實施例中，ASTR包括對靶抗原具有特異性的全長IgG重鏈且具有V_H、CH1、鉸鏈及CH2及CH3 (Fc) Ig域，若V_H域單獨足以賦予抗原特異性(「單域抗體」)。若兩者，則V_H及V_L域為產生完全活性ASTR所必要的，含有V_H之CAR及全長λ輕鏈(IgL)均引入至相同細胞毒性細胞中以產生活性ASTR。在另一實施例中，CAR之各ASTR包括至少兩種單鏈抗體可變片段(scFv)，各自對不同靶抗原具有特異性。已在不明顯破壞抗原結合或結合特異性之情況下研發出scFv，其中一個可變域(V_H或V_L)之C端經由多肽連接子繫留至另一可變域(分別V_L或V_H)之N端(Chaudhary等人, 「A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin」, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 第87卷, 第9491頁, 1990; Bedzyk等人, 「Immunological and structural characterization of a high affinity anti-fluorescein single-chain antibody」, *J. Biol. Chem.*, 第265卷, 第18615頁, 1990)。此等scFv不具有存在於天然抗體之重鏈及輕鏈中之恆定區(Fc)。對至少兩種不同抗原具有特異性的scFv以串聯方式配置。在一個實施例中，細胞外間隔子域可連接在ASTR與跨膜域之間。

【0160】在另一實施例中，scFv片段可融合至重鏈恆定域之全部或一部分。在另一實施例中，CAR之ASTR包括二價(或雙價)單鏈可變片段(二-scFv、雙-scFv)。在包括二-scFv之CAR中，各自對抗原具有特異性的兩種scFv連接在一起以形成具有兩個V_H及兩個V_L區之單一肽鏈(Xiong等人, 「Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding」, *Protein Engineering Design and Selection*, 第19卷, 第359頁至

第367頁, 2006; Kufer等 人, 「A revival of bispecific antibodies」, *Trends in Biotechnology*, 第22卷,第238頁至第244頁, 2004)。

【0161】在又一實施例中, ASTR包括雙功能抗體。在雙功能抗體中, 產生具有連接肽之scFv, 該等連接肽對於兩個可變區而言過短以至於無法摺疊在一起, 驅使scFv二聚。又較短連接子(一或兩個胺基酸)使得形成三聚體, 所謂的三功能抗體(triabodies/tribodies)。四功能抗體亦可用於ASTR中。

【0162】當兩種或多於兩種ASTR存在於CAR中時, ASTR在單一多肽鏈上經由寡或多肽連接子、Fc鉸鏈或膜鉸鏈區彼此共價連接。

【0163】藉由CAR靶向之抗原存在於組織中之細胞表面上或內部, 其靶向移除諸如腫瘤、腺體(例如前列腺)增生、疣及非所需脂肪組織。儘管CAR之ASTR更有效地識別且結合表面抗原, 亦可藉由CAR靶向細胞內抗原。在一些實施例中, 靶抗原較佳對癌症、發炎疾病、神經元病症、糖尿病、心血管疾病或傳染病具有特異性。靶抗原之實例包括由各種免疫細胞、癌瘤、肉瘤、淋巴瘤、白血病、生殖細胞腫瘤、母細胞瘤及與各種血液科疾病相關之細胞、自體免疫疾病及/或發炎疾病表現之抗原。

【0164】可藉由ASTR靶向之對癌症具有特異性的抗原包括以下中之一或多者: 4-IBB、5T4、腺癌抗原、 α -胎蛋白、Axl、BAFF、B-淋巴瘤細胞、C242抗原、CA- 125、碳酸酐酶9 (CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受 體)、CD28、CD30 (TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44 v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、纖維結合蛋白額外域-B、葉酸受體1、

GD2、GD3神經節苷脂、醣蛋白75、GPNMB、HER2/neu、HGF、人類分散因子受體激酶、IGF-1受體、IGF-I、IgG1、LI-CAM、IL-13、IL-6、胰島素樣生長因子I受體、整合素 $\alpha 5\beta 1$ 、整合素 $\alpha v\beta 3$ 、MORAb-009、MS4A1、MUC1、黏蛋白CanAg、N-羥乙醯基神經胺糖酸、NPC-1C、PDGF-R a、PDL192、磷脂醯絲胺酸、前列腺癌細胞、RANKL、RON、ROR1、ROR2、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、肌腱蛋白C、TGF β 2、TGF- β 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘤抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2或波形蛋白。

【0165】可藉由ASTR靶向之對發炎疾病具有特異性的抗原包括以下中之一或多者：AOC3 (VAP-1)、CAM-3001、CCL11 (伊紅趨素-1)、CD125、CD147 (基礎免疫球蛋白)、CD154 (CD40L)、CD2、CD20、CD23 (IgE受體)、CD25 (IL-2受體之鏈)、CD3、CD4、CD5、IFN- α 、IFN- γ 、IgE、IgE Fc區、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-22、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-6受體、整合素 $\alpha 4$ 、整合素 $\alpha 4\beta 7$ 、大羊駝、LFA-1 (CD11a)、MEDI-528、肌肉抑制素、OX-40、rhuMAb $\beta 7$ 、硬化蛋白、SOST、TGF β 1、TNF- α 或VEGF-A。

【0166】可藉由本發明之ASTR靶向之對神經元病症具有特異性的抗原包括 β 澱粉狀蛋白或MABT5102A中之一或多者。可藉由本發明之ASTR靶向之對糖尿病具有特異性的抗原包括L-I β 或CD3中之一或多者。可藉由本發明之ASTR靶向之對心血管疾病具有特異性的抗原包括C5、心臟肌凝蛋白、CD41 (整合素 α -lib)、纖維蛋白II、 β 鏈、ITGB2 (CD 18)及神經鞘胺醇-1-磷酸鹽中之一或多者。

【0167】可藉由本發明之ASTR靶向之對傳染病具有特異性的抗原包

括以下中之一或多者：炭疽毒素、CCR5、CD4、凝集因子A、細胞巨大病毒、細胞巨大病毒醣蛋白B、內毒素、大腸桿菌、B型肝炎表面抗原、B型肝炎病毒、HIV-1、Hsp90、A型流感血球凝集素、脂磷壁酸、綠膿桿菌、狂犬病病毒醣蛋白、呼吸道合胞病毒及TNF-a。

【0168】靶抗原之其他實例包括以特異性或擴增方式癌細胞上發現之表面蛋白質，例如IL-14受體、CD19、CD20及CD40（對於B細胞淋巴瘤）、路易斯(Lewis) Y及CEA抗原（對於各種癌瘤）、Tag72抗原（對於乳房及結腸直腸癌）、EGF-R（對於肺癌）、葉酸結合蛋白及HER-2蛋白質（其經常在人類乳房及卵巢癌瘤中擴增）或病毒蛋白，例如HIV之gpl20及gp41包膜蛋白、來自B型及C型肝炎病毒之包膜蛋白、人類細胞巨大病毒之醣蛋白B及其他包膜醣蛋白及來自腫瘤病毒，諸如卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒之包膜蛋白。其他潛在靶抗原包括CD4，其中配位體為HIV gpl20包膜醣蛋白，及其他病毒受體，例如ICAM，其為人類鼻病毒之受體及脊髓灰白質炎病毒之相關受體分子。

【0169】在另一實施例中，CAR可靶向接合癌症治療細胞，諸如本文中提及之NK細胞及其他細胞之抗原以藉由充當免疫效應細胞活化癌症治療細胞。此一個實例為靶向CD16A抗原以接合NK細胞對抗表現CD30之惡性病的CAR。雙特異性四價AFM13抗體為可遞送此作用之抗體之一個實例。此類型實施例之其他細節可見於例如Rothe, A.等人, 「A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma」, *Blood*, 2015年6月25日, VI. 125, 第26期, 第4024頁至第4031頁中。

【0170】在一個實施例中，ASTR靶向選自Ax1、ROR2及CD22之腫

瘤特異性抗原。

【0171】 在一些實施例中，ASTR為靶向癌症抗原Ax1之單鏈抗體，其可具有選自SEQ ID NO:2-5之核苷酸序列或選自SEQ ID NO:9-12之胺基酸序列。此等靶向癌症抗原Ax1之單鏈抗體含有具有SEQ ID NO: 6或7之核苷酸序列或SEQ ID NO: 13或14之胺基酸序列的人類IgG Fc區。相較於在pH 7.4下相同的對Ax1之結合活性，此等靶向癌症抗原Ax1之單鏈抗體在pH 6.0下具有提高的對Ax1之結合活性。

【0172】 在另一實施例中，ASTR為靶向癌症抗原ROR2之單鏈抗體，其可具有SEQ ID NO:16之核苷酸序列或SEQ ID NO:15之胺基酸序列。相較於在pH 7.4下相同的對ROR2之結合活性，靶向癌症抗原ROR2之此單鏈抗體在pH 6.0下具有提高的對ROR2之結合活性。

【0173】 靶向Ax1或ROR2之單鏈抗體適合用於與跨膜域及細胞內信號傳導域連接以產生CAR結構。

【0174】 CAR之細胞外間隔子域為位於ASTR與跨膜域之間的親水性區域。在一些實施例中，此域促進CAR之適當蛋白質摺疊。細胞外間隔子域為CAR之視情況選用之組分。細胞外間隔子域可包括選自抗體之Fc片段、抗體之鉸鏈區、抗體之CH2區、抗體CH3區、人造間隔子序列或其組合的域。細胞外間隔子域之實例包括CD8a鉸鏈、由可與三個甘胺酸(Gly)一樣小的多肽製成之人造間隔子以及IgG (諸如人類IgG4)之CH1及CH3區域。

【0175】 CAR之跨膜域為能夠跨越細胞毒性細胞之質膜之區域。跨膜域選自跨膜蛋白，諸如I型跨膜蛋白、人造疏水性序列或其組合之跨膜區。跨膜域之實例包括T細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈之跨膜區、CD28、CD3 ϵ 、

CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。合成跨膜域可包括苯丙胺酸、色胺酸及纈胺酸之三元組。視情況，較佳長度在2與10個胺基酸之間的短寡或多肽連接子可在CAR之跨膜域與細胞內信號傳導域之間形成鍵聯。甘胺酸-絲胺酸二元組在跨膜域與細胞內信號傳導域之間提供尤其適合的連接子。

【0176】本發明之CAR亦包括細胞內信號傳導域。細胞內信號傳導域轉導效應功能信號且引導細胞毒性細胞執行其專門的功能，亦即傷害及/或破壞靶細胞。細胞內信號傳導域之實例包括T細胞受體複合物或其同源物中之任一者之 ζ 鏈，例如 η 鏈、Fc γ Rly及 β 鏈、MB 1 (Iga)鏈、B29 (Ig)鏈等、人類CD3 ζ 鏈、CD3多肽(Δ 、 δ 及 ϵ)、syk家族酪胺酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪胺酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)及涉及T細胞轉導之其他分子，諸如CD2、CD5及CD28。具體言之，細胞內信號傳導域可為人類CD3 ζ 鏈、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受體之細胞質尾、帶有基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)之細胞質受體及其組合。

【0177】CAR中使用之胞內信號轉導域可包括各種其他免疫信號傳導受體之若干類型之細胞內信號傳導域，包括(但不限於)第一、第二及第三代T細胞信號傳導蛋白質，包括CD3、B7家族協同刺激及腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族受體(Park等人，「Are all chimeric antigen receptors created equal?」*J Clin Oncol.*, 第33卷,第651頁至第653頁, 2015)。另外，細胞內信號傳導域包括供NK及NKT細胞使用之信號傳導域(Hermanson,等人，「Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity」,*Front Immunol.*, 第6卷,第195頁, 2015)，諸

如NKp30 (B7-H6)之信號傳導域(Zhang等人, 「An NKp30-based chimeric antigen receptor promotes T cell effector functions and antitumor efficacy *in vivo*」, *J Immunol.*, 第189卷,第2290頁至第2299頁, 2012)及DAP12 (Topfer等人, 「DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy」, *J Immunol.*, 第194卷,第3201頁至第3212頁, 2015)、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10及CD3z。另外,細胞內信號傳導域亦包括含有基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)之人類免疫球蛋白受體之信號傳導域,諸如FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIC、FcγRIIIA、FcRL5 (Gillis等人, 「Contribution of Human FcγRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies」, *Front Immunol.*, 第5卷,第254頁, 2014)。

【0178】在一些實施例中,細胞內信號傳導域包括TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d之細胞質信號傳導域。CAR中之細胞內信號傳導域尤其較佳包括人類CD3ζ之細胞質信號傳導域。

【0179】本發明之CAR可包括協同刺激域,其具有增強記憶細胞之細胞增殖、細胞存活及發展之功能以用於表現CAR之細胞毒性細胞。本發明之CAR可包括一或多種協同刺激域,其選自TNFR超家族中之蛋白質之協同刺激域、CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD7、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、PD-1、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、LIGHT、NKG2C、B7-H3或其組合。若CAR包括多於一個協同刺激域,則此等域可以串聯方式配置,視情況藉由連接子分離。協同刺激域為可定位於CAR

中之跨膜域與細胞內信號傳導域之間的細胞內域。

【0180】在一些實施例中，本發明之CAR之兩種或多於兩種組分藉由一或多種連接子分離。舉例而言，在包括至少兩種ASTR之CAR中，兩種ASTR可藉由連接子分離。連接子為長度約1至100個胺基酸之寡或多肽區。在一些實施例中，連接子可為例如5-12個胺基酸長，5-15個胺基酸長，或5至20個胺基酸長。連接子可由可撓性殘基，如甘胺酸及絲胺酸構成，使得相鄰蛋白域相對於彼此自由移動。更長連接子，例如長於100個胺基酸之彼等者可結合本發明之替代性實施例使用，且可選擇以例如確保兩個相鄰域不會在空間上彼此干擾。可用於本發明中之連接子之實例包括(但不限於) 2A連接子(例如T2A)、2A樣連接子或其功能等效物。

條件活性抗原特異性靶向區

【0181】CAR為藉由上文所論述之所有不同域融合在一起以形成融合蛋白產生之嵌合蛋白。CAR典型地藉由包括編碼CAR之不同域之聚核苷酸序列之表現載體產生。用以識別且與靶細胞上之抗原結合之本發明之ASTR為條件活性的。具體言之，相較於對應親本或野生型蛋白質之ASTR，ASTR在正常生理條件下活性較低或失活且在異常條件下活性以用於與靶抗原結合。本發明提供一種自親本或野生型蛋白質或其結合域(親本或野生型ASTR)產生條件活性ASTR之方法。

【0182】適合於完整或部分地用於靶抗原之至少其結合域作為本發明中之ASTR之野生型蛋白質可藉由生成蛋白質庫且篩選對靶抗原具有所需結合親和力之蛋白質庫發現。野生型蛋白質可藉由篩選cDNA庫發現。cDNA庫為插入宿主細胞集合中之選殖cDNA (互補DNA)片段之組合，其一起構成生物體之轉錄組之一些部分。cDNA由完全經轉錄mRNA產生且

因此含有用於生物體之表現蛋白質之編碼序列。cDNA庫中之資訊為藉由篩選對靶抗原具有所需結合親和力之蛋白質庫發現具有所需特性之蛋白質的強力且適用的工具。

【0183】在一些實施例中，在野生型蛋白質為抗體之情況下，可藉由生成及篩選抗體庫發現野生型抗體。抗體庫可為多株抗體庫或單株抗體庫。可藉由將抗原直接注射至動物中或藉由向非人類動物投與抗原產生針對靶抗原之多株抗體庫。由此獲得之抗體表示結合至抗原之多株抗體庫。對於單株抗體庫之製備，可使用提供藉由連續細胞株培養產生之抗體之任何技術。實例包括融合瘤技術、三源融合瘤技術、人類B細胞融合瘤技術及EBV融合瘤技術(參見例如Cole (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 第77頁至第96頁)。描述產生單鏈抗體之技術(參見例如美國專利第4,946,778號)可經調適以產生單鏈抗體庫。

【0184】存在用於生成及篩選發現野生型抗體之抗體庫之其他方法。舉例而言，可利用完全人類抗體呈現庫。此類庫為呈現於宿主細胞表面上之抗體之群體。較佳地，抗體庫因為其具有結合至廣泛範圍的抗原之能力而代表抗體之人類抗體庫。因為抗體呈現於細胞之表面上，庫中各抗體之有效親和力(歸因於親合力)提高。不同於其他常用庫類型，諸如噬菌體呈現庫，在出於篩選及鑑別目的不太需要抗體之親合力之情況下，在本發明中藉由細胞表面呈現提供之超親合力為合乎需要的。細胞表面呈現庫實現鑑別低、中及高結合親和力抗體，以及鑑別篩選或選擇步驟中之非免疫原性及弱抗原決定基。

產生自母分子進化之分子

【0185】親本或野生型蛋白質或其結合域(親本或野生型ASTR)經受

一種突變誘發以產生突變多肽群體之方法，其可隨後經篩選以鑑別相較於親本或野生型ASTR，在異常條件下對靶抗原具有增強的結合親和力之突變ASTR，及視情況在正常生理條件下對靶抗原之結合親和力實質上相同或降低。

【0186】任何化學合成或重組誘變方法均可用於產生突變多肽群體。除非另外指明，否則可採用細胞生物學、細胞培養、分子生物學、轉殖基因生物學、微生物學、重組DNA及免疫學之習知技術實施本發明，此等習知技術屬於此項技術之技能範圍內。此類技術在文獻中已充分解釋。參見例如Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第2版, Sambrook、Fritsch及Maniatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, 第I卷及第II卷 (D. N. Glover編, 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編, 1984); Mullis等人美國專利第4,683, 195號; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames及S. J. Higgins編1984); Transcription And Translation (B. D. Hames及S. J. Higgins編1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller及M. P. Cabs編, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, 第154卷及第155卷 (Wu等人編), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer及Walker編, Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, 第I-IV卷(D. M. Weir及C. C. Blackwell編, 1986);

Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。

【0187】本發明提供一種用於產生編碼條件活性突變多肽之核酸突變體之方法，該方法包括藉由以下步驟修飾核酸：(i)一或多個核苷酸取代不同核苷酸，其中該核苷酸包括天然或非天然核苷酸；(ii)刪除一或多個核苷酸，(iii)添加一或多個核苷酸，或(iv)其任何組合。在一個態樣中，非天然核苷酸包括肌苷。在另一態樣中，該方法進一步包括分析由酶活性改變之經改造之核酸編碼之多肽，藉此鑑別編碼具有改變的酶活性之多肽的經改造之核酸。在一個態樣中，步驟(a)之修飾藉由PCR、易錯PCR、改組、寡核苷酸引導之突變誘發、組裝PCR、性PCR突變誘發、活體內突變誘發、卡匣突變誘發、遞歸集合突變誘發、指數集合突變誘發、位點特異性突變誘發、基因重組、基因位點飽和突變誘發、連接酶鏈反應、活體外突變誘發、連接酶鏈反應、寡核苷酸合成、任何DNA產生技術及其任何組合進行。在另一態樣中，該方法進一步包括修飾步驟之至少一次重複。

【0188】本發明進一步提供一種用於自兩個或多於兩個核酸製得聚核苷酸之方法，該方法包括：(a)鑑別兩個或多於兩個核酸之間的一致性區域及多樣性區域，其中核酸中之至少一者包括本發明之核酸；(b)提供序列對應於兩個或多於兩個核酸中之至少兩者之一組寡核苷酸；及(c)用聚合酶延長寡核苷酸，藉此製得聚核苷酸。

【0189】可在本發明之各種實施例中採用任何突變誘發技術。隨機或無規突變誘發藉由使母分子突變(經改造或改變)以得到具有非預定突變之一組後代分子的情形例示。因此，在活體外隨機突變誘發反應中，例如

不存在預期產生之特定預定產物；相反地，關於獲得之突變之精確性質且因此亦關於所產生之產物存在不確定性(因此無規)。隨機突變誘發體現在諸如易錯PCR及隨機改組之處理中，其中獲得之突變為無規或非預先確定的。可藉由易錯轉錄，諸如易錯PCR或使用不具有校對活性之聚合酶(參見Liao (1990) *Gene* 88: 107-111)、第一變異體形式或藉由複製突變菌株中之第一形式(突變宿主細胞進一步詳細論述於下文且一般熟知)產生變異體形式。突變菌株可包括錯配修復功能削弱之任何生物體中之任何突變體。此等包括mutS、mutT、mutH、mutL、ovrD、dcm、vsr、umuC、umuD、sbcB、recJ等之突變基因產物。藉由基因突變、等位基因置換、藉由添加試劑，諸如較小化合物或表現反義RNA之選擇性抑制或其他技術來實現削弱。可削弱所提及之基因或任何生物體中之同源基因。

【0190】 其他突變誘發方法包括寡核苷酸引導之突變誘發技術、易錯聚合酶鏈反應(易錯PCR)及卡匣突變誘發，其中親本聚核苷酸之特定區域經以合成方式誘變之寡核苷酸置換。在此等情況下，圍繞親本序列中之某些位點產生多個突變位點。

【0191】 在寡核苷酸引導之突變誘發中，短序列經以合成方式誘變之寡核苷酸置換。在寡核苷酸引導之突變誘發中，使用限制酶消化自聚核苷酸移除聚核苷酸之短序列且經合成聚核苷酸置換，其中不同鹼基已相對於初始序列發生改變。亦可藉由化學突變誘發改變聚核苷酸序列。化學誘變劑包括例如亞硫酸氫鈉、亞硝酸、羥胺、肼或甲酸。為核苷酸前驅體類似物之其他藥劑包括亞硝基胍、5-溴尿嘧啶、2-氨基嘌呤或吡啶。一般而言，將此等藥劑添加至PCR反應物而非核苷酸前驅體中，藉此使序列突變。亦可使用插入劑，諸如普羅黃素(proflavine)、吡啶黃素

(acriflavine)、奎納克林(quinacrine)及其類似物。聚核苷酸序列之無規突變誘發亦可藉由用X射線或紫外光照射來達成。一般而言，將如此誘變之質體聚核苷酸引入至大腸桿菌中且繁殖為混雜質體之池或庫。

【0192】易錯PCR使用低保真度聚合條件以在長序列內隨機地引入低水準之點突變。在未知序列之片段之混合物中，易錯PCR可用於誘變混合物。

【0193】在卡匣突變誘發中，單一模板之序列區塊典型地經(部分)隨機分組序列置換。Reidhaar-Olson J F及Sauer R T: Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* 241(4861):53-57, 1988。

【0194】替代地，可在本發明之各種實施例中採用非隨機或非無規突變誘發之任何技術。非隨機突變誘發藉由使母分子突變(經改造或改變)以得到具有一或多種預先確定的突變之後代分子的情形例示。應瞭解，存在一定數量之背景產物在存在分子處理之多種反應中為現實，且此等背景產物之存在不會減損具有預先確定的產物之突變誘發方法之非隨機性質。位點飽和突變誘發及合成接合重組為預期產物之精確化學結構為預先確定的突變誘發技術之實例。

【0195】位點飽和突變誘發之一種方法揭示於美國專利申請案公開案2009/0130718中，此方法提供對應於模板聚核苷酸密碼子之一組簡併引子，且進行聚合酶延伸以產生後代聚核苷酸，其含有對應於簡併引子之序列。後代聚核苷酸可表現且針對定向進化進行篩選。具體言之，此為用於產生一組後代聚核苷酸之方法，其包括以下步驟：(a)提供模板聚核苷酸之複本，各自包括複數個編碼模板多肽序列之密碼子；及(b)針對模板

聚核苷酸之各密碼子，進行以下步驟：(1)提供一組簡併引子，其中各引子包括對應於模板聚核苷酸密碼子之簡併密碼子及至少一個與鄰近於模板聚核苷酸密碼子之序列同源之相鄰序列；(2)提供使得引子退火至模板聚核苷酸複本之條件；及(3)由引子沿著模板進行聚合酶延伸反應；藉此產生後代聚核苷酸，其各自含有對應於退火引子之簡併密碼子的序列；藉此產生一組後代聚核苷酸。位點飽和突變誘發係關於定向進化核酸及針對所得相關結合活性篩選含有進化核酸之殖株。

【0196】 位點飽和突變誘發通常係關於以下方法：1)製備後代分子，其包括：包括聚核苷酸序列之分子、包括多肽序列之分子及部分包括聚核苷酸序列且部分包括多肽序列之分子，亦即經誘變以實現相對於一或多種上代或親代模板之至少一個點突變、添加、缺失及/或嵌合；2)針對對靶抗原之所需結合親和力，篩選後代分子(較佳使用高通量方法)；3)視情況獲得及/或編目關於親代及/或後代分子之結構性及/或及功能性資訊；及4)視情況重複步驟1)至3)中之任一者。

【0197】 在位點飽和突變誘發中，在稱為「密碼子位點飽和突變誘發」中產生(例如自親本聚核苷酸模板)後代聚核苷酸，各自具有至少一組直至三個連續點突變(亦即，不同鹼基包括新密碼子)，以使得每個密碼子(或每個家族簡併密碼子編碼相同胺基酸)在各密碼子位置處表示。對應於此後代聚核苷酸(且由其編碼)，亦產生一組後代多肽，各自具有至少一個單一胺基酸點突變。在一較佳態樣中，在稱為「胺基酸位點飽和突變誘發」中產生19個天然編碼多肽中之每一者之一個此類突變多肽，在沿著多肽每一個胺基酸位置形成 α -胺基酸取代。若使用額外胺基酸而非20個天然編碼胺基酸或除此之外，則此產生(針對沿著親本多肽每一個胺基酸位置)

總共20種包括初始胺基酸之不同後代多肽，或潛在地超過21種不同後代多肽。

【0198】亦可採用其他突變誘發技術，其涉及再結合且更尤其一種藉由含有部分同源性區域之聚核苷酸序列之活體內再分類方法製備編碼多肽之聚核苷酸，組裝聚核苷酸以形成至少一種聚核苷酸且針對具有適用特性之多肽之產生篩選聚核苷酸的方法。

【0199】在另一態樣中，突變誘發技術利用細胞之天然特性再結合分子及/或介導降低序列複雜度及具有同源性區域之重複或連續序列之程度的還原性處理。

【0200】可單獨或組合使用各種突變誘發技術以提供用於產生編碼生物活性混雜多肽之混雜聚核苷酸之方法。在實現此等及其他目標時，已根據本發明之一態樣提供一種用於將聚核苷酸引入至適合的宿主細胞中且在產生混雜多肽之條件下使宿主細胞生長之方法。

【0201】已藉由使用限制酶所產生之可相容黏性端接合2種聚核苷酸片段來製得嵌合基因，其中各片段衍生自單獨祖細胞(或親本)分子。另一實例為在親本聚核苷酸中單一密碼子位置之突變誘發(亦即，以實現密碼子取代、添加或缺失)以產生編碼單一位點突變誘發多肽之單一後代聚核苷酸。

【0202】另外，活體內位點特異性再結合系統已用以產生基因雜合體以及活體內再結合之無規方法及同源之間但質體上截短基因之再結合。亦藉由重疊延長及PCR報導突變誘發。

【0203】非無規方法已用於實現較大量之點突變及/或嵌合，例如綜合或窮盡性途徑已用於產生在特定突變分組內之所有分子物種，以便將功

能歸於模板分子中之特定結構組(例如特定單一胺基酸位置或包括兩個或多於兩個胺基酸位置之序列)，及分類及比較特定突變分組。

【0204】可在本發明中採用此等或其他進化方法中之任一者以自親本或野生型蛋白質產生突變多肽(庫)之新群體。

進化分子之表現

【0205】由進化步驟產生之突變聚核苷酸可或可不根據公佈協定在瓊脂糖凝膠上經尺寸分級，插入表現載體中，且經轉染至適當的宿主細胞中以產生突變多肽(表現)。表現可使用常規分子生物學技術。因此，表現步驟可使用各種已知方法。

【0206】舉例而言，簡言之，由進化步驟產生之突變聚核苷酸隨後使用標準分子生物學技術消化且接合至表現載體，諸如質體DNA。隨後使用標準協定將載體轉移至細菌或其他細胞中。此可在多孔盤，諸如96孔盤之個別孔中進行以便於高通量表現及篩選。針對各突變聚核苷酸重複方法。

【0207】將如所描述選擇及分離之聚核苷酸引入至適合的宿主細胞中。適合的宿主細胞為能夠促進再結合及/或減少重排之任何細胞。所選聚核苷酸較佳已在包括適當的控制序列之載體中。宿主細胞可為更高真核生物細胞，諸如哺乳動物細胞，或更低真核生物細胞，諸如酵母細胞，或較佳地，宿主細胞可為原核細胞，諸如細菌細胞。將構築體引入至宿主細胞中可藉由磷酸鈣轉染、DEAE-聚葡萄糖介導之轉染或電穿孔來實現(例如Ecker及Davis, 1986, Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:5372-5376)。

【0208】作為可使用之表現載體之代表性實例，可提及病毒粒子、

桿狀病毒、噬菌體、質體、噬菌粒、黏質體、福斯質粒(fosmid)、細菌人造染色體、病毒DNA (例如牛痘、腺病毒、水痘病毒、假性狂犬病及SV40衍生物)、PI基人造染色體、酵母質體、酵母人造染色體及對相關特定宿主(諸如芽孢桿菌屬、曲黴菌及酵母)具有特異性的任何其他載體。因此，舉例而言，DNA可包括在用於表現多肽之多種表現載體中之任一者中。此類載體包括染色體、非染色體及合成DNA序列。熟習此項技術者已知大量適合載體且其為可商購的。以下載體藉助於實例提供；細菌：pQE載體(Qiagen)、pBluescript質體、pNH載體、(λ -ZAP載體(Stratagene)；ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T (Pharmacia)；真核：pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLSV40 (Pharmacia)。然而，可使用任何其他質體或其他載體，只要其為可複製的且在宿主中可存活即可。本發明可採用低複本數或高複本數載體。

【0209】表現載體中之突變聚核苷酸序列可操作地連接於適當的表現控制序列(啟動子)以引導RNA合成。特別提及之細菌啟動子包括lad、lacZ、T3、T7、gpt、 λ PR、PL及trp。真核啟動子包括前早期CMV、HSV胸苷激酶、前及後SV40、來自反轉錄病毒之LTR及小鼠金屬硫蛋白-1。選擇適當的載體及啟動子完全在一般熟習此項技術者水平內。表現載體亦含有用於轉譯起始及轉錄終止之核糖體結合位點。載體亦可包括用於擴增表現之適當的序列。啟動子區域可選自使用氯黴素轉移酶(CAT)載體之任何所需基因或具有可選擇標記物之其他載體。另外，表現載體較佳含有一或多種可選擇標記基因以提供表現型特點以便於選擇經轉化之宿主細胞，諸如二氫葉酸還原酶或新黴素耐性(對於真核生物細胞培養物)或在大腸桿菌中諸如四環素或安比西林(ampicillin)耐性。

【0210】真核DNA轉錄可藉由將強化子序列插入至表現載體中來提高。強化子為藉由啟動子提高轉錄之10至300 bp之間的順式作用序列。當5'或3'至轉錄單元時，強化子可有效地提高轉錄。若位於內含子內或編碼序列自身內，則其亦有效。典型地，使用病毒強化子，包括SV40強化子、細胞巨大病毒強化子、多瘤病毒強化子及腺病毒強化子。亦常用來自哺乳動物系統之強化子序列，諸如小鼠免疫球蛋白重鏈強化子。

【0211】哺乳動物表現載體系統亦典型地包括可選擇標記基因。適合的標記物之實例包括二氫葉酸還原酶基因(DHFR)、胸苷激酶基因(TK)或賦予耐藥性之原核基因。前兩種標記基因更喜歡使用在未將胸苷添加至生長培養基中之情況下不具有生長能力之突變細胞株。經轉化之細胞可隨後藉由其在未補充培養基上生長之能力鑑別。用作標記物之原核耐藥性基因之實例包括賦予對G418、黴酚酸及潮黴素之耐藥性的基因。

【0212】含有相關DNA鏈段之表現載體可藉由眾所周知的方法轉移至宿主細胞中，視細胞生產宿主之類型而定。舉例而言，對於原核宿主細胞通常利用氯化鈣轉染，而磷酸鈣處理、脂質體轉染或電穿孔可用於真核宿主細胞。用於轉化哺乳動物細胞生產宿主之其他方法包括使用凝聚胺、原生質體融合、脂質體、電穿孔及顯微注射(一般參見Sambrook等人，同上)。

【0213】在表現載體已引入至適當的宿主中後，將宿主維持在適合於引入的突變聚核苷酸序列之高水準表現之條件下以產生突變多肽。表現載體在宿主生物體中典型地可以游離基因體或宿主染色體DNA之整體部分形式複製。通常，表現載體將含有選擇標記物，例如四環素或新黴素以准許偵測具有所需DNA序列之彼等經轉型之細胞(參見例如美國專利第

4,704,362號)。

【0214】因此，在本發明之另一態樣中，可藉由減少重排方法產生突變聚核苷酸。該方法涉及產生含有連續序列(初始編碼序列)之構築體，將其插入至適當的載體中，且其後續引入至適當的宿主細胞中。個別分子一致性之重排藉由具有同源性區域之構築體中之連續序列之間或半重複單元之間的組合方法進行。重排方法再結合及/或降低重複序列之複雜度及程度，且導致產生新穎分子物種。可應用各種處理來增強重排速率。此等可包括紫外線光或DNA損傷化學物質處理及/或使用呈現增強水準之「基因不穩定性」之宿主細胞株。因此，重排方法可涉及同源重組或半重複序列之天然特性以引導其自身進化。

【0215】細胞隨後繁殖且實現「減少重排」。減少重排方法之速率可藉由必要時引入DNA破壞刺激，活體內重排集中於「分子間」處理，統稱為細菌中之「再結合」，一般被視為「RecA依賴性」現象。本發明可依賴於宿主細胞之再結合處理以再結合且重排序列，或細胞介導減少處理以藉由缺失降低細胞中之半重複序列之複雜度的能力。此「減少重排」方法藉由「分子內」、RecA非依賴性方法進行。最終結果為分子重排至所有可能的組合中。

【0216】在一個態樣中，宿主生物體或細胞包括革蘭氏陰性細菌、革蘭氏陽性細菌或真核生物體。在本發明之另一態樣中，革蘭氏陰性細菌包括大腸桿菌或螢光假單胞菌。在本發明之另一態樣中，革蘭氏陽性細菌包括潛水鏈黴菌(*Streptomyces diversa*)、加氏乳桿菌(*Lactobacillus gasseri*)、雷特氏乳球菌(*Lactococcus lactis*)、乳脂鏈球菌(*Lactococcus cremoris*)或枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)。在本發明之另一態樣中，真核生

物體包括啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)、乳酸克魯維酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、多形漢遜酵母 (*Hansenula polymorpha*)或黑麴黴(*Aspergillus niger*)。作為適當的宿主之代表性實例，可提及：細菌細胞，諸如大腸桿菌、鏈黴菌、鼠傷寒沙門桿菌 (*Salmonella typhimurium*)；真菌細胞，諸如酵母；昆蟲細胞，諸如果蠅 S2 及夜蛾 Sf9；動物細胞，諸如 CHO、COS 或 Bowes 黑色素瘤；腺病毒；及植物細胞。選擇適當的宿主被認為根據本文中之教示內容在熟習此項技術者之範疇內。

【0217】除了諸如酵母之真核微生物之外，亦可使用哺乳動物組織細胞培養物來表現本發明之突變多肽(參見 Winnacker, 「From Genes to Clones」, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987))。真核細胞較佳，因為在此項技術中已研發出能夠分泌完整免疫球蛋白之多種適合的宿主細胞株，且包括 CHO 細胞株、各種 COS 細胞株、HeLa 細胞、骨髓瘤細胞株、B 細胞或融合瘤。此等細胞之表現載體可包括諸如複製起點、啟動子、強化子之表現控制序列(Queen 等人, *Immunol. Rev.*, 第 89 卷, 第 49 頁, 1986)，及諸如核糖體結合位點、RNA 剪接位點、多腺苷酸化位點之必需的加工資訊位點，及轉錄終止子序列。較佳表現控制序列為來源於免疫球蛋白基因、巨細胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳突狀瘤病毒及其類似物之啟動子。

【0218】在一個實施例中，真核宿主細胞選自 CHO、HEK293、IM9、DS-1、THP-1、Hep G2、COS、NIH 3T3、C33a、A549、A375、SK-MEL-28、DU 145、PC-3、HCT 116、Mia PACA-2、ACHN、

Jurkat、MM1、Ovcar 3、HT 1080、Panc-1、U266、769P、BT-474、Caco-2、HCC 1954、MDA-MB-468、LnCAP、NRK-49F及SP2/0細胞株；及小鼠脾臟細胞及兔PBMC。在一個態樣中，哺乳動物宿主細胞選自CHO或HEK293細胞株。在一個特定態樣中，哺乳動物宿主細胞為CHO-S細胞株。在另一特定態樣中，哺乳動物系統為HEK293細胞株。在另一實施例中，真核宿主為酵母細胞系統。在一個態樣中，真核宿主選自釀酒酵母酵母細胞或畢赤酵母細胞。

【0219】在另一實施例中，哺乳動物宿主細胞可商業上由合同研究或定製製造組織產生。舉例而言，對於重組抗體或其他蛋白質，Lonza (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland)可使用GS基因表現系統™技術，用CHOK1SV或NS0細胞生產宿主產生表現此等產物之載體。含有相關聚核苷酸之宿主細胞可在適於活化啟動子、選擇轉型體或擴增基因之經改造之習知養分培養基中培養。培養條件(諸如溫度、pH及類似條件)為先前用於經選擇用於表現之宿主細胞之培養條件，且對於一般熟習此項技術者而言將顯而易見。

【0220】如上文所論述，條件活性ASTR之表現最佳化可藉由所使用之載體(載體組分，諸如啟動子、剪接位點、5'及3'末端及側接序列)之最佳化、基因修飾宿主細胞以減少基因缺失及重排、藉由進化相關基因之活體內或活體外方法進化宿主細胞基因活性、藉由相關基因進化及/或藉由染色體寬宿主細胞突變誘發使宿主糖基化酶最佳化及選擇具有增強的表現能力之細胞的選擇策略來達成。

【0221】蛋白質表現可藉由多種已知方法誘發，且已公佈多種用於誘導蛋白質表現之基因系統。舉例而言，利用適當的系統，添加誘導劑將

誘導蛋白質表現。細胞隨後藉由離心粒化且移除上清液。可藉由用DNA酶、RNA酶及溶菌酶培育細胞來增濃周質蛋白質。在離心之後，含有新蛋白質之上清液轉移至新多孔盤且在分析之前儲存。

【0222】細胞典型地藉由離心採集、藉由物理或化學手段破壞且所得粗製提取物經保留以供進一步純化。在蛋白質表現中所採用之微生物細胞可藉由任何適宜方法，包括凍融循環、音波處理、機械破壞或使用細胞溶解劑來破壞。此類方法已為熟習此項技術者所熟知。表現的多肽或其片段可藉由包括以下之方法自重組細胞培養物回收且純化：硫酸銨或乙醇沈澱、酸提取、陰離子或陽離子交換層析、磷酸纖維素層析、疏水相互作用層析、親和性層析、羧磷灰石層析及凝集素層析。可視需要在完成多肽結構時使用蛋白質再摺疊步驟。必要時，可採用高效液相層析(HPLC)進行最終純化步驟。可藉由適宜高通量篩選或選擇方法之可用性輔助篩選條件活性ASTR。可採用細胞表面呈現表現及篩選技術(例如，如上文所定義)來篩選條件活性ASTR之突變蛋白質。

篩選鑑別可逆或不可逆突變體

【0223】鑑別所需分子最直接藉由在容許條件及野生型條件下量測蛋白質活性來實現。可隨後選擇具有最大活性比率(容許/野生型)之突變體且藉由使用標準方法組合個別突變產生點突變置換。組合置換蛋白質庫隨後篩選在容許與野生型條件之間呈現最大差異活性之彼等蛋白質。

【0224】可使用多種方法篩選上清液之活性，例如使用高通量活性分析，諸如螢光分析，以鑑別在任何所需特性(溫度、pH等)下敏感之蛋白質突變體。舉例而言，為了篩選時間敏感突變體，使用可商購的受質在較低溫度(諸如25攝氏度)下且在初始蛋白質起作用之溫度(諸如37攝氏度)下

測定各個別突變體之酶促或抗體活性。可在多種培養基，尤其諸如血清及BSA中進行篩選。可起初在多孔分析型式，諸如96孔分析中進行反應，且使用不同型式，諸如14 ml試管型式進行確認。

【0225】在一個態樣中，該方法進一步包括在測試候選物之條件生物活性之前修飾核酸或多肽中之至少一者，在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試多肽在宿主細胞或宿主生物體中之改良表現，在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試約pH 3至約pH 12範圍內之pH內的酶活性。在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試約pH 5至約pH 10範圍內之pH內的酶活性。在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試約pH 6至約pH 8範圍內之pH內的酶活性。在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試在pH 6.7及pH 7.5下之酶活性。在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試約4°C至約55°C範圍內之溫度內的酶活性。在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試約15°C至約47°C範圍內之溫度內的酶活性。在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試約20°C至約40°C範圍內之溫度內的酶活性。在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試在25°C及37°C之溫度下之酶活性。在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試在正常滲透壓及異常(陽性或陰性)滲透壓下之酶活性，在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試在正常電解質濃度及異常(陽性或陰性)電解質濃度下之酶活性。待測試電解質濃度選自鈣、鈉、鉀、鎂、氯離子、碳酸氫鹽及磷酸鹽濃度中之一者，在另一態樣中，步驟(c)之測試進一步包括測試導致穩定化反應產物之酶活性。

【0226】在另一態樣中，本發明提供具有酶活性之特異性結合至本發明之多肽或其片段的純化抗體。在一個態樣中，本發明提供具有酶活性

之特異性結合至多肽之抗體之片段。

抗體及基於抗體之篩選方法

【0227】本發明提供特異性結合至本發明之酶之經分離或重組抗體。此等抗體可用於分離、鑑別或定量本發明之酶或相關多肽。此等抗體可用於分離本發明範疇內之其他多肽或其他相關酶。抗體可經設計以結合至酶之活性位點。因此，本發明提供使用本發明之抗體抑制酶之方法。

【0228】抗體可用於免疫沈澱、染色、免疫親和力管柱及其類似者中。必要時，可藉由免疫，繼而分離多肽或核酸，將多肽擴增或選殖及固定於本發明之陣列上來產生編碼特異性抗原之核酸序列。替代地，本發明之方法可用於改變待改造之細胞所產生之抗體之結構，例如可提高或降低抗體之親和力。此外，製得或改變抗體之能力可為藉由本發明之方法工程改造至細胞中之表型。

【0229】免疫、產生及分離抗體(多株及單株)之方法為熟習此項技術者已知且描述於科學及專利文獻中，參見例如Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991)；Stites (編) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (第7版) Lange Medical Publications, Los Altos, Calif. (「Stites」)；Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (第2版) Academic Press, New York, N. Y. (1986)；Kohler (1975) 「Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity」, Nature 256:495；Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York。除使用動物之傳統活體內方法外，抗體亦可例如使用表現噬菌體呈現庫之重組抗體結合位點活體外產生。參見例

如Hoogenboom (1997) 「Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies」, *Trends Biotechnol.* 15:62-70 ; 及Katz (1997) 「Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display」, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45 。

【0230】多肽或肽可用於產生特異性結合至多肽之抗體，例如本發明之酶。所得抗體可用於免疫親和層析法程序以分離或純化多肽或以判定多肽是否存在於生物樣品中。在此類程序中，使蛋白質製備物，諸如提取物或生物樣品與能夠特異性結合至本發明之多肽中之一者的抗體接觸。

【0231】在免疫親和力程序中，抗體附著至固體載體，諸如珠粒或其他管柱基質上。在抗體特異性結合至本發明之多肽中之一者之條件下使蛋白質製備物與抗體接觸。在洗滌移除未尤其結合蛋白質之後，溶離出尤其結合多肽。

【0232】生物樣品中之蛋白質結合至抗體之能力可使用熟習此項技術者熟悉之多種程序中之任一者測定。舉例而言，可藉由用諸如螢光劑、酶標記或放射性同位素之可偵測標記來標記抗體，從而測定結合。替代地，抗體對樣品之結合可使用在其上具有此類可偵測標記之二級抗體偵測。特定分析包括ELISA分析、夾心分析、放射免疫分析及西方墨點法。

【0233】可藉由將多肽直接注射至動物中或藉由向非人類動物投與多肽來獲得針對本發明之多肽產生的多株抗體。由此獲得之抗體將隨後結合多肽自身。以此方式，甚至僅編碼多肽之片段之序列亦可用於產生可結合至完整天然多肽之抗體。此類抗體可隨後用於自表現多肽之細胞分離多肽。

【0234】對於單株抗體之製備，可使用提供藉由連續細胞株培養產生之抗體之任何技術。實例包括融合瘤技術、三源融合瘤技術、人類B細胞融合瘤技術及EBV融合瘤技術(參見例如Cole (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 第77頁至第96頁)。

【0235】針對產生單鏈抗體描述之技術(參見例如美國專利第4,946,778號)可經調適以產生本發明之多肽之單鏈抗體。替代地，轉基因小鼠可用於表現此等多肽或其片段之人類化抗體。針對本發明之多肽產生之抗體可用於自其他生物體及樣品篩選類似多肽(例如酶)。在此類技術中，使來自生物體之多肽與抗體接觸且偵測到特異性結合抗體之彼等多肽。上文所描述之程序中之任一者可用於偵測抗體結合。

篩選方法及「在線」監視裝置

【0236】在實踐本發明之方法中，多種設備及方法可與本發明之多肽及核酸結合使用，例如以篩選多肽之酶活性，篩選作為酶活性之潛在調節劑，例如活化劑或抑制劑之化合物，篩選結合至本發明之多肽之抗體，篩選混雜至本發明之核酸中之核酸，篩選表現本發明之多肽之細胞及其類似者。

陣列或「生物晶片」

【0237】本發明之核酸或多肽可固定或施加至陣列中。陣列可用於篩選或監測組合物(例如小分子、抗體、核酸等)之庫結合至本發明之核酸或多肽或調節本發明之核酸或多肽之活性的能力。舉例而言，在本發明之一個態樣中，監測參數為酶基因之轉錄表現。細胞之一或多種或所有轉錄物可藉由包括細胞轉錄物之樣品或代表細胞轉錄物或與細胞轉錄物互補之核酸之雜交，藉由與陣列或「生物晶片」上之固定核酸雜交來量測。藉由

使用微晶片上核酸之「陣列」，細胞轉錄物中之一些或全部可同時進行定量。替代地，包括基因組核酸之陣列亦可用以測定藉由本發明之方法製得之經工程改造之新菌株之基因型。「多肽陣列」亦可用以同時定量複數個蛋白質。本發明可用任何已知「陣列」實施，該等「陣列」亦稱為「微陣列」或「核酸陣列」或「多肽陣列」或「抗體陣列」或「生物晶片」或其變化形式。陣列一般為複數個「點」或「靶元件」，各靶元件包括限定量之一或多種生物分子，例如固定於受質表面限定區域上以便特異性結合至樣品分子之寡核苷酸，例如mRNA轉錄物。

【0238】在實踐本發明之方法中，任何已知陣列及/或製得及使用陣列之方法可完整或部分地或其變化形式併入，如例如美國專利第6,277,628號；第6,277,489號；第6,261,776號；第6,258,606號；第6,054,270號；第6,048,695號；第6,045,996號；第6,022,963號；第6,013,440號；第5,965,452號；第5,959,098號；第5,856,174號；第5,830,645號；第5,770,456號；第5,632,957號；第5,556,752號；第5,143,854號；第5,807,522號；第5,800,992號；第5,744,305號；第5,700,637號；第5,556,752號；第5,434,049號中所描述；亦參見例如WO 99/51773；WO 99/09217；WO 97/46313；WO 96/17958；亦參見例如Johnston (1998) 「Gene chips: Array of hope for understanding gene regulation」, *Curr. Biol.* 8:R171-R174；Schummer (1997) 「Inexpensive Handheld Device for the Construction of High-Density Nucleic Acid Arrays」, *Biotechniques* 23:1087-1092；Kern (1997) 「Direct hybridization of large-insert genomic clones on high-density gridded cDNA filter arrays」, *Biotechniques* 23:120-124；Solinas-Toldo

(1997) 「Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances」, *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399-407 ; Bowtell (1999) 「Options Available-From Start to Finish~for Obtaining Expression Data by Microarray」, *Nature Genetics Supp.* 21:25-32。亦參見已公佈的美國專利申請案第20010018642號；第20010019827號；第20010016322號；第20010014449號；第20010014448號；第20010012537號；第20010008765號。

毛細管陣列

【0239】毛細管陣列，GIGAMATRIX™ Diversa Corporation, San Diego, Calif.可用於本發明之方法中。本發明之核酸或多肽可固定或施加至陣列，包括毛細管陣列中。陣列可用於篩選或監測組合物(例如小分子、抗體、核酸等)之庫結合至本發明之核酸或多肽或調節本發明之核酸或多肽之活性的能力。毛細管陣列提供用於固持及篩選樣品之其他系統。舉例而言，樣品篩選設備可包括形成為相鄰毛細管陣列之複數個毛細管，其中各毛細管包括至少一個界定用於保持樣品之內腔之壁。該設備可進一步包括安置於陣列中之相鄰毛細管之間的填隙物質及形成於填隙物質內之一或多種參考標誌。用於篩選樣品之毛細管(其中毛細管經調適用於結合在毛細管陣列中)可包括：第一壁，其界定用於保持樣品之內腔；及第二壁，其由過濾材料形成，用於過濾提供給內腔激發樣品之激發能量。多肽或核酸，例如配位體可引入至第一組分中成為毛細管陣列之毛細管之至少一部分。毛細管陣列之各毛細管可包括至少一個界定用於保持第一組分之內腔之壁。空氣氣泡可在第一組分之後引入至毛細管中。第二組分可引入至毛細管中，其中第二組分與第一組分藉由空氣氣泡隔開。相關樣品可以

用可偵測粒子標記之第一液體形式引入至毛細管陣列之毛細管中，其中毛細管陣列之各毛細管包括至少一個界定用於保持第一液體及可偵測粒子之內腔之壁，且其中至少一個壁塗佈有用於將可偵測粒子結合至至少一個壁之結合材料。該方法可進一步包括自毛細管移除第一液體，其中結合的可偵測粒子維持在毛細管內，且將第二液體引入至毛細管中。毛細管陣列可包括複數個個別毛細管，其包括至少一個界定內腔之外壁。毛細管外壁可為融合在一起之一或多個壁。類似地，該壁可界定柱形、方形、六邊形或任何其他幾何形狀之內腔，只要該壁形成用於保留液體或樣品之內腔即可。毛細管陣列之毛細管可緊靠著固持在一起以形成平面結構。毛細管可藉由融合(例如在毛細管由玻璃製成之情況下)、膠合、鍵結或並排夾持結合在一起。毛細管陣列可由任何數目之個別毛細管，例如100至4,000,000範圍內之毛細管形成。毛細管陣列可形成具有約100,000或多於100,000個結合在一起之個別毛細管的微滴定盤。

工程改造條件活性抗體

【0240】條件活性抗體可經工程改造以產生多特異性條件活性抗體。多特異性抗體可為具有多抗原決定基特異性之抗體，如WO 2013/170168中所描述。多特異性抗體包括(但不限於)：包括重鏈可變域(V_H)及輕鏈可變域(V_L)之抗體，其中 $V_H V_L$ 單元具有多抗原決定基特異性；具有兩個或多於兩個 V_L 及 V_H 域之抗體，其中各 $V_H V_L$ 單元結合至不同抗原決定基；具有兩個或多於兩個單一可變域之抗體，其中各單一可變域結合至不同抗原決定基；及包括一或多個抗體片段之抗體；以及包括已共價或非共價連接之抗體片段之抗體。

【0241】為了構築包括雙特異性抗體之多特異性抗體，獲得具有至

少一個游離硫氫基之抗體片段。抗體片段可獲自全長條件活性抗體。條件活性抗體可以酶促方式消化以產生抗體片段。例示性酶促消化方法包括(但不限於)胃蛋白酶、番木瓜蛋白酶及Lys-C。例示性抗體片段包括(但不限於)Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、雙功能抗體(Db)；縱排雙功能抗體(taDb)、線性抗體(參見美國專利第5,641,870號，實例2；Zapata等人, *Protein Eng.*, 第8卷,第1057頁至第1062頁 (1995))；單臂抗體、單一可變域抗體、微型抗體(Olafsen等人(2004) *Protein Eng. Design & Sel.*,第17卷,第315頁至第323頁)、單鏈抗體分子、Fab表現庫產生之片段、抗個體基因型(抗Id)抗體、互補決定區(CDR)及抗原決定基結合片段。抗體片段亦可使用DNA重組技術產生。編碼抗體片段之DNA可選殖至質體表現載體或噬菌粒載體中且在大腸桿菌中直接表現。抗體酶促消化方法、DNA選殖及重組蛋白表現方法為熟習此項技術者所熟知。

【0242】可使用習知技術純化抗體片段且可經受還原以產生游離硫醇基。具有游離硫醇基之抗體片段可與交叉連接子，例如雙-順丁烯二醯亞胺反應。純化此類交聯抗體片段，且隨後與具有游離硫醇基之第二抗體片段反應。純化兩個抗體片段交聯之最終產物。在某些實施例中，各抗體片段為Fab及最終產物，其中兩種Fab經由雙-順丁烯二醯亞胺(在本文中稱為雙順丁烯二醯亞胺基-(硫基-Fab)₂或雙-Fab)連接。可採用此類多特異性抗體及抗體類似物(包括雙-Fab)快速合成大量抗體片段組合或天然抗體或特定抗體/片段組合之結構性變異體。

【0243】可用經改造之交叉連接子合成多特異性抗體以使得額外功能性部分可附著至多特異性抗體。經修飾之交叉連接子允許附著任何硫氫基反應性部分。在一個實施例中，N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基硫基乙酸酯

(SATA)附著至雙-順丁烯二醯亞胺以形成雙-順丁烯二醯亞胺基-乙醯基硫基乙酸酯(BMata)。在經遮蔽之硫醇基脫保護之後，具有硫氫基反應性(或硫醇反應性)部分之任何官能基均可附著至多特異性抗體。

【0244】例示性硫醇反應性試劑包括多官能性連接子試劑、採集(亦即，親和力)標記試劑(例如生物素-連接子試劑)、偵測標籤(例如螢光團試劑)、固相固定化試劑(例如SEPHAROSE™、聚苯乙烯或玻璃)或藥物-連接子中間物。硫醇反應性試劑之一個實例為N-乙基順丁烯二醯亞胺(NEM)。具有經改造之交叉連接子之此類多特異性抗體或抗體類似物可進一步與藥物部分試劑或其他標記反應。多特異性抗體或抗體類似物與藥物-連接子中間物之反應分別提供多特異性抗體-藥物共軛物或抗體類似物-藥物共軛物。

【0245】用於製得多特異性抗體之其他技術亦可用於本發明中。描述此等技術之參考文獻包括：(1) Milstein及Cuello, *Nature*, 第305卷,第537頁(1983))；WO 93/08829；及Traunecker等人, *EMBO J.*, 第10卷,第3655頁 (1991)關於具有不同特異性之兩種免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之重組共表現；(2)美國專利第5,731,168號關於「杵-臼」工程改造；(3) WO 2009/089004A1關於用於製得抗體Fc-異二聚分子之工程改造靜電導向作用；(4)美國專利第4,676,980號；及Brennan等人, *Science*,第229卷,第81頁 (1985)關於交聯兩個或多於兩個抗體或片段；(5) Kostelny等人, *J. Immunol.*, 第148卷,第1547頁至第1553頁 (1992)關於使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體；(6) Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,第90卷,第6444頁至第6448頁 (1993)關於使用製得雙特異性抗體片段之「雙功能抗體」技術；(7) Gruber等人, *J. Immunol.*, 第152卷,第5368頁 (1994)關於

使用單鏈Fv (sFv)二聚體；(8) Tutt等人 *J. Immunol.* 147: 60 (1991)關於製備三特異性抗體；及(9) US 2006/0025576A1及Wu等人 *Nature Biotechnology*,第25卷,第1290頁至第1297頁 (2007)關於具有三個或多於三個功能性抗原結合位點之經工程改造之抗體，包括「章魚抗體」或「雙重可變域免疫球蛋白」(DVD)。

【0246】本發明之多特異性抗體亦可如WO/2011/109726中所描述產生。

【0247】在一個實施例中，用於跨越血腦屏障(BBB)之條件活性抗體經工程改造以製得多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。此多特異性抗體包括結合BBB-R之第一抗原結合位點及結合大腦抗原之第二抗原結合位點。至少BBB-R之第一抗原結合位點為條件活性的。大腦抗原為大腦中表現之抗原，其可用抗體或小分子靶向。此類抗原之實例包括(但不限於)： β -分泌酵素1 (BACE1)、澱粉樣 β ($A\beta$)、表皮生長因子受體(EGFR)、人類表皮生長因子受體2 (HER2)、Tau、載脂蛋白E4 (ApoE4)、 α -突觸核蛋白、CD20、杭丁頓蛋白、普里昂蛋白(PrP)、白胺酸富集重複激酶2 (LRRK2)、帕金森蛋白(parkin)、早老素1、早老素2、 γ 分泌酵素、死亡受體6 (DR6)、澱粉樣蛋白前驅蛋白(APP)、p75神經營養蛋白受體(p75NTR)及凋亡蛋白酶6。在一個實施例中，抗原為BACE1。

【0248】BBB具有藉由BBB受體(BBB-R) (其為允許大分子在整個BBB中傳送之特異性受體)介導之內源性傳送系統。舉例而言，可結合至BBB-R之抗體可使用內源性傳送系統在整個BBB中傳送。此類抗體可充當用於藉由使用穿過BBB之內源性BBB受體介導之傳送系統在整個BBB中傳送藥物或其他藥劑之媒劑。此類抗體無需對BBB-R具有高親和力。

不為對BBB-R具有低親和力之條件活性抗體之抗體已描述為與高親和力抗體相比更有效地跨越BBB，如US 2012/0171120中所描述。

【0249】用於工程改造抗體以進入大腦之其他方法為工程改造抗體以經由中樞神經系統淋巴血管遞送至大腦。因此，抗體可經工程改造以結合至或模擬免疫細胞，諸如T細胞，或經由淋巴血管行進至中樞神經系統之滑膜或腦脊髓流體。中樞神經系統之淋巴血管細節描述於例如Louveau, A.等人，「Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels」，*Nature* 523，第337頁至第341頁，2015年7月16日中，且文章引用此文章截至本申請案申請為公開可用的。

【0250】不同於傳統抗體，不需要條件活性抗體對BBB-R具有低親和力以跨越BBB且保持在大腦內部。條件活性抗體可對BBB之血液側之BBB-R具有高親和力，且對BBB之大腦側親和力很少或沒有。藥物，諸如藥物共軛物可與條件活性抗體偶合以與抗體一起在整個BBB中傳送至大腦中。

【0251】BBB-R為能夠在整個血腦屏障中傳送分子之大腦內皮細胞上表現之跨膜受體蛋白。BBBR之實例包括：運鐵蛋白受體(TfR)；胰島素受體；胰島素樣生長因子受體(IGF-R)；低密度脂蛋白受體，其包括(但不限於)低密度脂蛋白受體相關蛋白1 (LRP1)及低密度脂蛋白受體相關蛋白8 (LRP8)；及肝素結合表皮生長因子樣生長因子(HB-EGF)。本文中之例示性BBB-R為運鐵蛋白受體(TfR)。TfR為跨膜醣蛋白(分子量約為180,000)，其包括在脊椎動物中涉及鐵的攝入的二硫化物鏈接之兩個次單元(每一者之表觀分子量約為90,000)。

【0252】在一些實施例中，本發明提供針對BBB-R由親本或野生型

抗體產生之條件活性抗體。條件活性抗體結合BBB之血液側之BBB-R，且與BBB之大腦側之親本或野生型抗體相比對BBB-R具有更低親和力。在一些其他實施例中，條件活性抗體與BBB之血液側之野生型或親本抗體相比對BBB-R具有親和力，且對BBB之大腦側之BBB-R不具有親和力。

【0253】血漿為與大腦細胞外液體(ECF)極其不同之體液。如Somjen (「Ions in the Brain: Normal Function, Seizures, and Stroke」, Oxford University Press, 2004, 第16頁及第33頁)及Redzic (「Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences」, *Fluids and Barriers of the CNS*, 第8卷:3, 2011)所論述，大腦細胞外液體與血漿相比具有明顯更少的 K^+ ，更多的 Mg^{2+} 及 H^+ 。血漿與大腦ECF之間的離子濃度差異導致兩種流體之間的滲透壓及重量莫耳滲透濃度之顯著差異。表1展示兩種血漿及大腦ECF之以毫莫耳計常見離子之濃度。

表1.血漿(動脈血漿)及大腦細胞外液體(CSF)中之常見離子

	動脈血漿		CSF	
	人類	大鼠	人類	大鼠
Na ⁺	150	148	147	152
K ⁺	4.6	5.3	2.9	3.4
Ca，總計	2.4	3.1	1.14	1.1
Ca ²⁺ ，游離	1.4	1.5	1.0	1.0
pCa				
Mg，總計	0.86	0.8	1.15	1.3
Mg ²⁺ ，游離	0.47	0.44	0.7	0.88
H ⁺	0.000039	0.000032	0.000047	0.00005
pH	7.41	7.5	7.3	7.3
Cl ⁻	99		119	
HCO ₃ ⁻	26.8	31	23.3	28

【0254】 大腦ECF亦含有與血漿相比明顯更多的乳酸鹽及與血漿相比明顯更少的葡萄糖(Abi-Saab等人, 「Striking Differences in Glucose and Lactate Levels Between Brain Extracellular Fluid and Plasma in Conscious Human Subjects: Effects of Hyperglycemia and Hypoglycemia」, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 第22卷,第271頁至第279頁, 2002)。

【0255】 因此，BBB之兩側之間的若干生理條件不同，諸如pH、各種物質(諸如乳糖、葡萄糖、K⁺、Mg²⁺)之濃度、滲透壓及重量莫耳滲透濃度。對於pH之生理條件，人類血漿具有與人類大腦ECF相比更高的pH。對於K⁺濃度之生理條件，大腦ECF具有與人類血漿相比更低的K⁺濃度。對於Mg²⁺濃度之生理條件，人類大腦ECF具有與人類血漿相比明顯更多的Mg²⁺。對於滲透壓之生理條件，人類大腦ECF具有與人類血漿不同之滲透壓。在一些實施例中，大腦ECF之生理條件可為患有特定神經病症之患者之大腦ECF之組合物、pH、滲透壓及重量莫耳滲透濃度，其可與一般群體之大腦ECF之生理條件不同。

【0256】 本發明因此提供一種針對BBB-R進化編碼模板抗體之DNA

以產生突變DNA庫之方法。突變DNA庫隨後表現以獲得突變抗體。篩選突變抗體之條件活性抗體，該條件活性抗體在至少一個血漿生理條件下結合至BBB-R且在大腦ECF中之至少一個大腦生理條件下相比於模板抗體對BBB-R具有低親和力或不具有親和力。因此，所選突變型抗體在血漿側對BBB-R具有低或高親和力且在大腦ECF側對BBB-R具有低親和力或不具有親和力。此所選突變型抗體用作在整個BBB中傳送之條件活性抗體。

【0257】此類條件活性抗體有利於跨越BBB且保持在大腦ECF中。在大腦側對BBB-R之低親和力降低速率(或移除)，條件活性抗體在整個BBB中自大腦傳送回且相對於模板抗體回到血液中。

【0258】在一些其他實施例中，本發明提供一種針對BBB-R進化編碼模板抗體之DNA以產生突變DNA庫之方法。突變DNA庫隨後表現以獲得突變抗體。篩選突變抗體之條件活性抗體，其在至少一個血漿生理條件下結合至BBB-R且在至少一個大腦生理條件下對BBB-R之親和力很少或沒有。因此，所選突變型抗體在血漿側對BBB-R具有親和力且在大腦ECF側對BBB-R之親和力很少或沒有。此所選突變型抗體為條件活性抗體。

【0259】此類條件活性抗體有利於跨越BBB且保持在大腦ECF中。在結合至血漿側之BBB-R之後，條件活性抗體在整個BBB中傳送，且對大腦ECF側之BBB-R幾乎無親和力意謂條件活性抗體不大可能傳送出大腦。

【0260】條件活性抗體對BBB-R之親和力可藉由其半數最大抑制濃度(IC₅₀)量測，其為將已知BBB-R配位體對BBB-R之結合抑制50%所需要之抗體之量度。常見途徑為執行競爭性結合分析，諸如競爭性ELISA分析。量測TfR (BBB-R)之IC₅₀之例示性競爭性ELISA分析為提高抗TfR抗

體之濃度與生物素化TfR^A競爭結合至TfR。抗TfR抗體競爭性ELISA可在塗佈有2.5 µg/ml PBS中純化小鼠TfR細胞外域之Maxisorp培養盤(Neptune, N.J.)中在4°C下進行隔夜。培養盤用PBS/0.05% Tween 20洗滌且使用含Superblock阻斷緩衝液之PBS (Thermo Scientific, Hudson, N.H.)阻斷。將各個別抗TfR抗體(1:3連續稀釋液)之滴定法與生物素化抗TfR^A (0.5 nM最終濃度)組合且在室溫下添加至培養盤中1小時。培養盤用PBS/0.05% Tween 20洗滌，且將HRP-抗生蛋白鏈菌素(Southern Biotech, Birmingham)添加至培養盤中且在室溫下培育1小時。培養盤用PBS/0.05% Tween 20洗滌，且使用TMB受質(BioFX Laboratories, Owings Mills)偵測到結合至培養盤之生物素化抗TfR^A。

【0261】高IC₅₀指示需要更多條件活性抗體來抑制BBB-R之已知配位體之結合，且因此抗體對該BBB-R之親和力相對較低。相反地，低IC₅₀指示需要更少條件活性抗體來抑制已知配位體之結合，且因此抗體對該BBB-R之親和力相對較高。

【0262】在一些實施例中，血漿中之BBB-R之條件活性抗體之IC₅₀可為約1 nM至約100 µM，或約5 nM至約100 µM，或約50 nM至約100 µM，或約100 nM至約100 µM，或約5 nM至約10 µM，或約30 nM至約1 µM，或約50 nM至約1 µM。

滑液之條件活性生物蛋白

【0263】關節疾病為殘疾之主要原因且在工業化國家中提早退休。關節疾病經常導致關節處之破壞，其難以修復。滑液為面對關節面之軟骨與滑膜之間的人類或動物身體之關節(例如膝部、髖部、肩部)之滑液腔中發現之體液。滑液為軟骨提供營養且亦用作關節之潤滑劑。軟骨及滑膜細

胞分泌充當關節面之間的潤滑劑之液體。人類滑液包括約85%水。其來源於血漿滲透液，其自身由水、溶解蛋白質、葡萄糖、凝血因子、礦物質離子、激素等構成。諸如白蛋白及球蛋白之蛋白質存在於滑液中且咸信在潤滑關節區域方面起重要作用。一些其他蛋白質亦發現於人類滑液中，包括醣蛋白，諸如 α -1-酸醣蛋白(AGP)、 α -1-抗胰蛋白酶(A1AT)及潤滑素。

【0264】滑液具有與身體其他部分極其不同之組合物。因此，滑液具有與身體之其他部分，諸如血漿不同之生理條件。舉例而言，滑液具有小於約10 mg/dL葡萄糖，而人類血漿中之平均正常葡萄糖含量為約100 mg/dL，全天在70與100 mg/dL之間的範圍內波動。另外，滑液中之總蛋白質含量為約血漿蛋白質含量之三分之一，因為諸如蛋白質之大分子不容易傳送通過滑膜進入滑液中。亦已發現，人類滑液之pH高於人類血漿中之pH(Jebens等人，「On the viscosity and pH of synovial fluid and the pH of blood」, The Journal of Bone and Joint Surgery, 第41 B卷,第388頁至第400頁, 1959；Farr等人，「Significance of the hydrogen ion concentration in synovial fluid in Rheumatoid Arthritis」, Clinical and Experimental Rheumatology, 第3卷,第99頁至第104頁, 1985)。

【0265】因此，滑液具有與身體之其他部分之彼等者，諸如血漿中之生理條件不同的若干生理條件。滑液具有高於身體之其他部分，尤其血漿之pH。滑液具有與身體之其他部分，諸如血漿相比更低濃度之葡萄糖。滑液亦具有與身體之其他部分，諸如血漿相比更低濃度之蛋白質。

【0266】藉由將抗體引入至滑液中，若干抗體已用於治療關節疾病。舉例而言，受傷關節中之滑液已知含有影響骨關節炎進展之多種因子(參見例如Fernandes等人，「The Role of Cytokines in Osteoarthritis

Pathophysiology」, *Biorheology*,第39卷,第237頁至第246頁, 2002)。藉由活化滑膜細胞產生之細胞介素, 諸如介白素-1 (IL-1)及腫瘤壞死因子- α (TNF- α)已知上調基質金屬蛋白酶(MMP)基因表現。MMP上調導致關節中之基質及非基質蛋白衰減。中和細胞介素之抗體可阻止骨關節炎進展。

【0267】使用抗體作為藥物為治療關節疾病之有前景的策略。舉例而言, 已研發出治療骨關節炎之抗體(諸如針對聚集蛋白聚糖或聚蛋白聚糖酶之抗體), 骨關節炎在關節疾病中迄今為止具有最大發病率(WO1993/022429A1)。已研發出用於診斷或治療為發炎性、自體免疫、神經退化性或惡性疾病/病症之關節疾病, 諸如關節炎的針對乙醯化高遷移率族匣1 (HMGB1)之抗體。此抗體可用於偵測滑液中之HMGB1之乙醯化形式(WO 2011/157905A1)。亦已研發出治療關節之結締組織及軟骨損傷之其他抗體(CD20抗體)。

【0268】然而, 此等抗體之抗原經常在帶有重要生理功能之身體其他部分中表現。針對此等抗原(但在治療關節疾病方面有效)之抗體亦可明顯地干擾此等抗原在身體其他部分中之正常生理功能。因此, 患者可能經歷嚴重副作用。因此需要研發治療劑, 諸如可以在滑液中之更高親和力優先結合至其抗原(蛋白質或其他大分子), 同時不結合或僅弱結合至身體其他部分中之相同抗原以便降低副作用的針對細胞介素或其他抗原之抗體。

【0269】此類條件活性生物蛋白可為條件活性抗體。在一些實施例中, 本發明亦提供為除抗體外之蛋白質之條件活性生物蛋白。舉例而言, 可藉由本發明研發優先調節滑液中之免疫反應之條件活性免疫調節因子, 其可對身體其他部分之免疫反應具有較少或無作用。

【0270】條件活性生物蛋白可為細胞介素信號傳導之條件活性抑制

劑(SOC)。此等SOC中之多者涉及抑制JAK-STAT信號傳導路徑。細胞介素信號傳導之條件活性抑制劑可優先抑制滑液中之細胞介素信號傳導，同時不會或在較低程度上抑制身體其他部分中之細胞介素信號傳導。

【0271】 在一些實施例中，本發明提供來源於親本或野生型生物蛋白之條件活性生物蛋白。與親本或野生型生物蛋白相比，條件活性生物蛋白在至少一種生理條件下在身體之某些部分中，諸如在血漿中具有更低活性，且與親本或野生型生物蛋白相比在至少一種生理條件下在滑液中具有更高活性。此類條件活性生物蛋白可優先在滑液中起作用，但不或在較低程度上作用於身體其他部分。因此，此類條件活性生物蛋白可具有降低的副作用。

【0272】 在一些實施例中，條件活性生物蛋白為針對滑液中之抗原或曝露於滑液之抗原之抗體。此類抗原可為涉及關節疾病中之免疫反應/發炎之任何蛋白質，但抗原經常為細胞介素。條件活性抗體與相同抗原之親本或野生型抗體相比在至少一種生理條件下在身體其他部分(諸如血漿)中對抗原具有更低的親和力，而與親本或野生型抗體相比在滑液之至少一種生理條件下對抗原具有更高的親和力。此類條件活性抗體可弱結合或根本不結合至身體其他部分中之抗原，但結合，例如強有力地且緊密地結合或更強結合至滑液中之抗原。

用於腫瘤之條件活性生物蛋白

【0273】 實體腫瘤中之癌細胞能夠在其環境中形成腫瘤微環境以支持癌細胞之生長及轉移。腫瘤微環境為腫瘤存在之細胞環境，包括周圍血管、免疫細胞、成纖維細胞、其他細胞、可溶因子、信號傳導分子、細胞外基質及可促進贅生性轉型之機械線、支持腫瘤生長及侵入、保護腫瘤免

受宿主免疫性、促進治療劑耐性且為潛伏轉移瘤提供茁壯成長之生態棲位。腫瘤及其周圍微環境密切相關且不斷相互作用。腫瘤可藉由釋放細胞外信號、促進腫瘤血管生成及誘導外周免疫耐受來影響其微環境，而微環境中之免疫細胞可影響癌細胞之生長及進化。參見Swartz等人「Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy」, *Cancer Res*, 第72卷,第2473頁至第2480頁, 2012。

【0274】腫瘤微環境經常低氧。隨著腫瘤塊增大，腫瘤內部更遠離現有血液供給源生長，其導致向腫瘤微環境完全供應氧之困難。相較於血漿中約40 mm Hg之氧分壓，在超過50%局部晚期實體腫瘤中，腫瘤環境中之氧分壓低於5 mm Hg。相比之下，身體其他部分不為低氧。低氧環境導致基因不穩定性，其與癌症進展相關，經由下調核苷酸切除修復及錯配修復路徑。低氧亦造成低氧誘導因子1 α (HIF1- α)上調，其誘導血管生成，且與較不良預後相關及與癌轉移相關之基因活化。參見Weber等人, 「The tumor microenvironment」, *Surgical Oncology*, 第21卷,第172頁至第177頁, 2012及Blagosklonny, 「Antiangiogenic therapy and tumor progression」, *Cancer Cell*, 第5卷,第13頁至第17頁, 2004。

【0275】另外，腫瘤細胞往往會依賴於不需要氧之乳酸發酵所產生之能量。如此腫瘤細胞不大可能使用需要氧之正常好氧性呼吸。使用乳酸發酵之結果為腫瘤微環境為酸性(pH 6.5-6.9)，與典型地為中性或微鹼性之身體其他部分相反。舉例而言，人類血漿具有約7.4之pH。參見Estrella等人, 「Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion」, *Cancer Research*, 第73卷,第1524頁至第1535頁, 2013。腫瘤微環境中之養分可用性歸因於相較於位於身體其他部分之細胞相對較高的

增殖癌細胞養分需求亦較低。

【0276】另外，腫瘤微環境亦含有身體其他部分中不常見之多種不同細胞類型。此等細胞類型包括內皮細胞及其前驅體、外被細胞、平滑肌細胞、成纖維細胞、癌瘤相關成纖維細胞、肌成纖維細胞、嗜中性白血球、嗜酸性球、嗜鹼性球、肥大細胞、T及B淋巴球、自然殺手細胞及抗原呈遞細胞(APC)，諸如巨噬細胞及樹突狀細胞(Lorusso等人, 「The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis」, *Histochem Cell Biol*, 第130卷, 第1091頁 至 第1103頁, 2008)。

【0277】因此腫瘤微環境具有與身體其他部分之彼等者不同的至少若干生理條件，諸如血漿中之生理條件。腫瘤微環境具有低於身體其他部分，尤其血漿(pH 7.4)之pH (酸性)。腫瘤微環境具有與身體其他部分，諸如血漿相比更低濃度之氧。此外，腫瘤微環境具有與身體其他部分，尤其血漿相比更低的養分可用性。腫瘤微環境亦具有身體其他部分，尤其血漿中不常見之一些不同細胞類型。

【0278】一些癌症藥物包括可穿透至腫瘤微環境中且作用於其中癌細胞之抗體。用於癌症之基於抗體之療法為沿用已久的且已成為用於治療患有血液學惡性病及實體腫瘤之患者之最成功且重要的策略中之一者。存在由相比於正常組織過度表現、突變或在癌細胞中選擇性地表現之人類癌細胞表現之細胞表面抗原之較寬陣列。此等細胞表面抗原為抗體癌症療法之極佳目標。

【0279】可藉由抗體靶向之癌細胞表面抗原屬於若干不同類別。造血分化抗原為與分化(CD)群組叢集通常相關之醣蛋白且包括CD20、

CD30、CD33及CD52。細胞表面分化抗原為正常及腫瘤細胞兩者表面上發現之醣蛋白及碳水化合物之不同群組。涉及生長及分化信號傳導之抗原經常為生長因子及生長因子受體。癌症患者中之抗體靶向之生長因子包括CEA2、表皮生長因子受體(EGFR；亦稱為ERBB1) 12、ERBB2 (亦稱為HER2) 13、ERBB3 (REF.18)、MET (亦稱為HGFR) 19、胰島素樣生長因子1受體(IGF1R) 20、肝配蛋白受體A3 (EPHA3) 21、腫瘤壞死因子(TNF)相關細胞凋亡誘導配位體受體1 (TRAILR1；亦稱為TNFRSF10A)、TRAILR2 (亦稱為TNFRSF10B)及核因子- κ B配位體之受體活化因子(RANKL；亦稱為TNFSF11) 22。涉及血管生成之抗原通常為支持新微血管形成之蛋白質或生長因子，包括血管內皮生長因子(VEGF)、VEGF受體(VEGFR)、整合素 α V β 3及整合素 α 5 β 1 (REF.10)。腫瘤基質及細胞外基質為腫瘤必不可少的支撐結構。治療劑靶向之基質及細胞外基質抗原包括纖維母細胞活化蛋白(FAP)及肌腱蛋白。參見Scott等人, 「Antibody therapy of cancer」, *Nature Reviews Cancer*, 第12卷,第278頁至第287頁, 2012。

【0280】除了抗體之外，其他生物蛋白亦已展示在治療癌症方面之前景。實例包括腫瘤抑制劑，諸如視網膜胚細胞瘤蛋白質(pRb)、p53、pVHL、APC、CD95、ST5、YPEL3、ST7及ST14。誘導癌細胞之細胞凋亡之一些蛋白質亦可引入至腫瘤中以用於縮小腫瘤之尺寸。存在至少兩種可誘導腫瘤之細胞凋亡之機制：腫瘤壞死因子誘導機制及Fas-Fas配位體介導機制。涉及兩種凋亡機制中之任一者之蛋白質中之至少一些可引入至腫瘤中用於治療。

【0281】癌症幹細胞為具有產生特定癌症樣品中發現之所有細胞類

型之能力，並因此形成腫瘤之癌細胞。其可經由自體更新之幹細胞處理及分化成多種細胞類型產生腫瘤。咸信癌症幹細胞以不同群體形式留存在腫瘤中且藉由產生新腫瘤導致復發及癌轉移。靶向癌症幹細胞之特定療法之發展可能改善癌症患者之生存期及生活品質，尤其對於轉移性疾病之罹患患者而言。

【0282】用於治療腫瘤之此等藥物經常干擾除腫瘤外身體其他部分中之正常生理功能。舉例而言，誘導腫瘤之細胞凋亡之蛋白質亦可誘導身體之一些其他部分之細胞凋亡，因此造成副作用。在抗體用於治療腫瘤之實施例中，抗體之抗原亦可在執行正常生理功能之身體其他部分中表現。舉例而言，單株抗體貝伐單抗(bevacizumab) (靶向血管內皮生長因子)阻止腫瘤血管生長。此抗體亦可阻止血管生長或身體其他部分修復，因此造成出血、創傷癒合不佳、血凝塊及腎損傷。研發主要或單獨集中於靶向腫瘤之條件活性生物蛋白為更有效腫瘤療法特別需要的。

【0283】在一些實施例中，本發明提供一種由可為腫瘤治療候選物之親本或野生型生物蛋白產生之條件活性生物蛋白。條件活性生物蛋白與親本或野生型生物蛋白相比在至少一種生理條件下在除腫瘤微環境外之身體部分，諸如血漿中具有更低的活性，而其與親本或野生型生物蛋白相比在至少一種生理條件下在腫瘤微環境中具有更高的活性。此類條件活性生物蛋白可優先作用於腫瘤微環境中之癌細胞以便治療腫瘤，且因此將不大可能造成副作用。在生物蛋白為針對腫瘤細胞表面上之抗原之抗體(其中抗原曝露於腫瘤微環境中)之實施例中，條件活性抗體與身體其他部分，例如非腫瘤微環境中之親本或野生型抗體相比對抗原具有更低的親和力，而其與腫瘤微環境中之親本或野生型抗體相比對抗原具有更高的親和力。

此類條件活性抗體可弱結合或根本不結合至身體其他部分中之抗原，但更大結合或強有力地且緊密地結合至腫瘤微環境中之抗原。

【0284】在一些實施例中，條件活性抗體為針對免疫檢查點蛋白之抗體，使得抑制免疫檢查點。此類條件活性抗體具有以下中之至少一者：
(1)與條件活性抗體起源之親本或野生型抗體相比在腫瘤微環境中對免疫檢查點蛋白提高的結合親和力；及(2)與條件活性抗體起源之親本或野生型抗體相比在非腫瘤微環境中對免疫檢查點蛋白降低的結合親和力。

【0285】免疫檢查點充當免疫系統之內源抑制性路徑以維持自身耐受性且調節對抗原刺激，亦即，外源分子、細胞及組織之免疫反應之持續時間及程度，參見Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, 第12卷, 第252頁至第264頁, 2012。藉由抑制一或多種檢查點蛋白質來抑制免疫檢查點可能導致免疫系統，尤其T細胞之超活化，因此誘導免疫系統攻擊腫瘤。適合於本發明之檢查點蛋白質包括CTLA4及其配位體CD80及CD86，PD1及其配位體PDL1及PDL2，T細胞免疫球蛋白及黏蛋白-3 (TIM3)及其配位體GAL9，B及T淋巴細胞衰減因子(BTLA)及其配位體HVEM (疱疹病毒侵入介體)，諸如殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)之受體，淋巴球活化基因-3 (LAG3)及腺苷A2A受體(A2aR)，以及配位體B7-H3及B7-H4。額外適合的免疫檢查點蛋白描述於Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, 第12卷, 第252頁至第264頁, 2012及Nirschl及Drake, *Clin Cancer Res*, 第19卷, 第4917頁至第4924頁, 2013中。

【0286】CTLA-4及PD1為最佳已知免疫檢查點蛋白中之兩者。CTLA-4可下調T細胞活化之路徑(Fong等人, *Cancer Res.* 69(2):609- 615, 2009；及Weber, *Cancer Immunol. Immunother*, 58:823-830, 2009)。阻

斷CTLA-4已展示強化T細胞活化及增殖。CTLA-4抑制劑包括抗CTLA-4抗體。抗CTLA-4抗體結合至CTLA-4且阻斷CTLA-4與其配位體CD80或CD86之相互作用，藉此阻斷CTLA-4與其配位體相互作用誘發之免疫反應下調。

【0287】檢查點蛋白質PD1已知在感染發炎反應時抑制外周組織中之T細胞之活性且限制自體免疫。活體外PD1阻斷可響應於特異性抗原標靶或混合淋巴細胞反應中之同種異體細胞之刺激而增強T細胞增殖及細胞介素產生。PD1表現與降低的免疫反應之間的較強相關性展示起因於PD1之抑制性功能，亦即，係藉由誘導免疫檢查點(Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, 12: 252-264, 2012)。PD1阻斷可藉由多種機制，包括結合PD1或其配位體之抗體PDL1或PDL2實現。

【0288】過去研究已發現針對若干檢查點蛋白質之抗體(CTLA4、PD1、PD-L1)。此等抗體在藉由抑制免疫檢查點，藉此使免疫系統，尤其T細胞超活化攻擊腫瘤來治療腫瘤方面有效(Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, 第12卷,第252頁至第264頁, 2012)。然而，超活化的T細胞亦可攻擊宿主細胞及/或組織，導致患者身體之附帶損傷。因此，基於使用此等已知抗體抑制免疫檢查點之療法難以處理且患者風險為嚴重問題。舉例而言，FDA批准之針對CTLA-4之抗體歸因於其高毒性帶有黑色方框警告。

【0289】本發明藉由超活化的T細胞藉由提供針對免疫檢查點蛋白之條件活性抗體解決附帶損傷之問題。此等條件活性抗體優先活化腫瘤微環境中之免疫檢查點。在相同時間，非腫瘤微環境，例如正常身體組織中之免疫檢查點不受條件活性抗體抑制或抑制較少以使得在非腫瘤微環境中對身體之附帶損傷之可能性降低。此目的藉由將條件活性抗體工程改造為與

在非腫瘤微環境中相比在腫瘤微環境中活性更高來實現。

【0290】在一些實施例中，針對免疫檢查點蛋白之條件活性抗體可具有至少約1.1，或至少約1.2，或至少約1.4，或至少約1.6，或至少約1.8，或至少約2，或至少約2.5，或至少約3，或至少約5，或至少約7，或至少約8，或至少約9，或至少約10，或至少約15，或至少約20的腫瘤微環境中之免疫檢查點蛋白結合活性與非腫瘤微環境中之相同免疫檢查點蛋白結合活性之比率。用於量測抗體之結合活性之典型的分析為ELISA分析。

【0291】高度免疫原性腫瘤，諸如惡性黑素瘤最易受藉由免疫系統操作來實現之超活化免疫系統的攻擊。因此，針對免疫檢查點蛋白之條件活性抗體可對於治療此類高度免疫原性腫瘤而言尤其有效。然而，其他類型之腫瘤亦易受超活化免疫系統的攻擊。

【0292】在一些實施例中，針對免疫檢查點蛋白之條件活性抗體可用於組合療法中。舉例而言，組合療法可包括針對腫瘤細胞表面分子(腫瘤特異性抗原)之條件活性抗體及針對免疫檢查點蛋白之條件活性抗體。在一個實施例中，條件活性抗體對腫瘤細胞表面分子之結合活性及條件活性抗體對免疫檢查點蛋白之結合活性兩者均可存在於單一蛋白質，亦即，如本文所揭示之雙特異性條件活性抗體中。在一些其他實施例中，組合療法可包括針對腫瘤細胞表面分子(腫瘤特異性抗原)之條件活性抗體及針對兩種或多於兩種不同免疫檢查點蛋白之兩種或多於兩種條件活性抗體。在一個實施例中，所有此等結合活性可存在於單一蛋白質，亦即，如本文所揭示之多特異性抗體中。

【0293】因為條件活性抗體相較於針對條件活性抗體起源之相同腫

瘤細胞表面分子或檢查點蛋白質之親本或野生型抗體之活性在腫瘤微環境中活性更高，所以此等組合療法可提供增強療效及毒性顯著降低兩者。此等條件活性抗體，尤其針對免疫檢查點蛋白之抗體之降低的毒性可允許安全使用強力抗體，諸如如本文所描述之ADC抗體以及更高劑量之抗體。

【0294】在一些實施例中，針對檢查點蛋白質之條件活性抗體可呈前藥形式。舉例而言，條件活性抗體可為在裂解且變為藥物形式之前不具有所需藥物活性之前藥。前藥可優先在腫瘤微環境中裂解，因為催化此類裂解之酶優先存在於腫瘤微環境中或因為相較於非腫瘤微環境中之裂解位點之可接近性，條件活性抗體使得腫瘤微環境中之裂解位點更易接近。

針對幹細胞生態棲位之條件活性生物蛋白，包括腫瘤幹細胞

【0295】幹細胞存在於稱作體內幹細胞生態棲位之環境中，其構成組織生理機能之基本單元，整合介導幹細胞響應於生物體需求之信號。但生態棲位亦可藉由對幹細胞或其他標靶施加異常功能來誘導病變。幹細胞與其生態棲位之間的相互作用產生維持組織及幹細胞治療劑之最終設計所必需之動態系統(Scadden, 「The stem-cell niche as an entity of action」, Nature, 第441卷, 第1075頁至第1079頁, 2006)。脊椎動物中之常見幹細胞生態棲位包括生殖系幹細胞生態棲位、造血幹細胞生態棲位、毛囊幹細胞生態棲位、腸道幹細胞生態棲位及心血管幹細胞生態棲位。

【0296】幹細胞生態棲位為與身體其他部分(例如血漿)不同的專門環境(Drummond-Barbosa, 「Stem Cells, Their Niches and the Systemic Environment: An Aging Network」, Genetics, 第180卷, 第1787頁至第1797頁, 2008 ; Fuchs, 「Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche」, Cell, 第116卷, 第769頁至第778頁, 2004)。幹細胞生態棲位

為低氧的，其中氧化性DNA損傷降低。氧含量之直接量測已揭示與血漿相比，骨髓一般為完全低氧的(約1%-2% O₂) (Keith等人, 「Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer」, Cell, 第129卷,第465頁至第472頁, 2007；Mohyeldin等人, 「Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche」, Cell Stem Cell, 第7卷,第150頁至第161頁, 2010)。另外，幹細胞生態棲位需要具有調節生態棲位內之幹細胞特性之若干其他因子：細胞外基質組分、生長因子、細胞介素及包括pH、離子強度(例如Ca²⁺濃度)及代謝物之環境之生理化學性質之因子。

【0297】因此，幹細胞生態棲位具有與身體其他部分之彼等者，諸如血漿中之生理條件不同的至少若干生理條件。幹細胞生態棲位具有與身體其他部分，尤其血漿相比更低的氧濃度(1-2%)。包括pH及離子強度之幹細胞生態棲位之其他生理條件亦可與身體其他部分不同。

【0298】幹細胞療法為介入策略，其將新成體幹細胞引入至受損組織中以便治療疾病或損傷。此策略視幹細胞自體更新且以不同程度之分化能力產生後續後代之能力而定。幹細胞療法提供可以排斥反應及副作用之最小風險潛在地替換體內患病及受損區域之組織更新之顯著可能性。因此，將藥物(生物蛋白(例如抗體)或化學化合物)遞送至幹細胞生態棲位以便影響幹細胞更新及分化為幹細胞療法之重要部分。

【0299】關於幹細胞生態棲位如何影響哺乳動物中之幹細胞更新及/或分化存在若干實例。首先在皮膚中，其中β-1整合素已知在原始細胞上區別表現且經由與基質醣蛋白配位體相互作用參與幹細胞群體之受限定位。第二，在神經系統中，肌腱蛋白C之不存在改變類神經幹細胞數目及

室下區中之功能。肌腱蛋白C似乎調節幹細胞對纖維母細胞生長因子2 (FGF2)及骨形態生成蛋白4 (BMP4)之靈敏度，使得幹細胞傾向提高。第三，其他基質蛋白，含有Arg-Gly-Asp之唾液蛋白、骨橋蛋白(OPN)現已展現促進造血幹細胞調節。OPN與已知在造血幹細胞上之若干受體CD44及 $\alpha 4$ 及 $\alpha 5\beta 1$ 整合素相互作用。OPN產量可顯著改變，尤其在成骨細胞活化之情況下。OPN缺陷型動物具有提高的HS細胞數目，因為不具有OPN導致在刺激性條件下之超生理性幹細胞擴增。因此，OPN似乎充當造血幹細胞數目之約束，在恆穩條件或刺激下限制幹細胞數目。參見Scadden, 「The stem-cell niche as an entity of action」, *Nature*, 第441卷,第1075頁至第1079頁, 2006。

【0300】Xie等 人「Autocrine signaling based selection of combinatorial antibodies that transdifferentiate human stem cells」, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 第110卷,第8099頁至第8104頁, 2013)揭示使用抗體影響幹細胞分化之方法。抗體為粒細胞群落刺激因子受體之促效劑。不同於活化細胞沿著預定路徑分化之天然粒細胞群落刺激因子，經分離之促效劑抗體使人類骨髓譜系CD34+骨髓細胞轉分化成類神經先驅細胞。Melidoni等 人(「Selecting antagonistic antibodies that control differentiation through inducible expression in embryonic stem cells」, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 第110卷,第17802頁至第17807頁, 2013)亦揭示使用抗體干擾FGF4與其受體FGFR1 β 之間的相互作用，因此阻斷自分泌FGF4介導之胚胎幹細胞分化的方法。

【0301】配位體/受體在幹細胞分化中之功能知識已實現出於調節或甚至引導幹細胞分化的目的應用生物蛋白干擾此等配位體/受體之策略。

經由將抗體投與至幹細胞生態棲位中控制未經基因改造之人類幹細胞之分化的能力可提供基於幹細胞之治療劑之新離體或活體內途徑。在一些實施例中，本發明提供由親本或野生型生物蛋白產生之條件活性生物蛋白，其能夠進入幹細胞生態棲位，包括癌症幹細胞以調節幹細胞或腫瘤發展。條件活性生物蛋白具有與親本或野生型生物蛋白相比在至少一種生理條件下在身體其他部分中更低的活性，而其與親本或野生型生物蛋白相比在至少一種生理條件下在幹細胞生態棲位，例如癌症幹細胞環境中具有更高的活性。此類條件活性生物蛋白將不大可能造成副作用且優先作用於幹細胞生態棲位以調節幹細胞更新及分化。在一些實施例中，條件活性生物蛋白為抗體。此類條件活性抗體可弱結合或根本不結合至身體其他部分中之其抗原，但強有力地且緊密地結合至幹細胞生態棲位中之抗原。

【0302】 本發明之針對滑液、腫瘤微環境及幹細胞生態棲位之條件活性生物蛋白藉由使編碼親本或野生型生物蛋白之DNA進化以產生突變DNA庫之方法產生。突變DNA庫隨後表現以獲得突變蛋白質。篩選突變蛋白質之條件活性生物蛋白，其與親本或野生型生物蛋白相比在選自由滑液、腫瘤微環境及幹細胞生態棲位組成之群的身體之第一部分之至少一種生理條件下具有更高的活性，且與親本或野生型生物蛋白相比在至少一種生理條件下在與身體之第一部分不同的身體之第二部分處具有更低的活性。身體之第二部分可為血漿。此類所選突變生物蛋白為在身體之第一部分中具有高活性但在身體之第二部分中具有低活性之條件活性生物蛋白。

【0303】 此類條件活性生物蛋白有利於減少親本或野生型蛋白質之副作用，因為條件活性生物蛋白在條件活性生物蛋白並不意欲起作用之身體其他部分中具有更低的活性。舉例而言，若條件活性生物蛋白意欲引入

至腫瘤微環境中，則條件活性生物蛋白在除腫瘤微環境外之身體部分中具有低活性之事實意謂此類條件活性生物蛋白將不大可能干擾除腫瘤微環境外之身體部分中之正常生理功能。在相同時間，條件活性生物蛋白在腫瘤微環境中具有高活性，其使得條件活性生物蛋白在治療腫瘤方面療效更高。

【0304】 歸因於降低的副作用，相較於親本或野生型生物蛋白，條件活性生物蛋白將允許安全地使用明顯更高劑量之蛋白質。此尤其有益於針對細胞介素或生長因子之抗體，因為針對細胞介素或生長因子之抗體可能干擾身體其他部分細胞介素或生長因子之正常生理功能。藉由使用條件活性生物蛋白，在降低的副作用之情況下，更高劑量可用於實現更高療效。

【0305】 作用於滑液、腫瘤微環境或幹細胞生態棲位中之一者中之條件活性生物蛋白亦可實現使用新藥物標靶。使用傳統的生物蛋白作為治療劑可能導致不可接受之副作用。舉例而言，抑制表皮生長因子受體(EGFR)可極有效地抑制腫瘤生長。然而，抑制EGFR之藥物將亦抑制皮膚及胃腸道(GI)之生長。副作用使得EGFR不適合作為腫瘤藥物標靶。使用僅在腫瘤微環境中以高親和力結合至EGFR，而在身體任何其他部分處無親和力或親和力極低之條件活性抗體將明顯地降低副作用且同時抑制腫瘤生長。在此情況下，EGFR可藉由使用條件活性抗體而成為有效新腫瘤藥物標靶。

【0306】 在另一實例中，抑制細胞介素經常有利於修復關節損傷。然而，抑制身體其他部分中之細胞介素亦可抑制身體之免疫反應，造成免疫缺乏症。因此，滑液中之細胞介素不為研發用於治療關節損傷之傳統抗

體藥物之理想標靶。然而，藉由使用優先結合至滑液中之細胞介素，而不結合或僅弱結合至身體其他部分中之相同細胞介素之條件活性抗體，可顯著降低免疫缺乏症之副作用。因此，藉由使用條件活性抗體，滑液中之細胞介素可成為用於修復關節損傷之適合的標靶。

用於容易發炎之器官/組織之條件活性生物蛋白

【0307】在一些實施例中，條件活性生物蛋白經設計以優先作用於容易發炎之器官或組織中，諸如淋巴結、扁桃體、腺樣增殖體及鼻竇。容易發炎之額外器官及組織可見於解剖學教科書，諸如Elsevier公佈之Henry Gray之Gray's Anatomy,第41版, 2015中。

【0308】此等器官及組織典型地在其發炎後展現至少一種異常條件。舉例而言，相較於例如身體其他部分，諸如人類血漿之正常生理條件，此等發炎器官及組織可具有更高滲透壓及/或更低濃度之一或多種離子。另外，相比於身體其他部分，諸如人類血漿之正常生理條件，此類發炎器官及組織中可能存在更高濃度之小分子、乳酸、細胞介素及白血球。

【0309】在一些實施例中，可藉由本發明使用選自發炎區域中遇到之一或多種異常條件的異常條件及人類血漿中之正常生理條件產生條件活性生物蛋白。此類條件活性生物蛋白將因此與親本或野生型生物蛋白之活性相比在器官/組織中在發炎狀態下具有更高的活性且與親本或野生型生物蛋白之活性相比在人類血漿中具有更低的活性。此類條件活性生物蛋白可優先作用於身體發炎區域，但將在未發炎之身體區域中具有很少或沒有活性。

條件活性病毒粒子

【0310】病毒粒子已長期用作將蛋白質、核酸分子、化學化合物或

放射性同位素傳送至靶細胞或組織之遞送媒劑。常用作遞送媒劑之病毒粒子包括反轉錄病毒、腺病毒、慢病毒、疱疹病毒及腺相關病毒。病毒粒子經常在配位體-受體結合系統中經由用作特異性結合至用作靶細胞之靶蛋白之細胞蛋白質之識別蛋白的表面蛋白質識別其靶細胞(Lentz, 「The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents」, *J. of Gen. Virol.*, 第71卷,第751頁至第765頁, 1990)。舉例而言, 病毒識別蛋白可為靶細胞上受體之配位體。配位體與受體之間的特異性允許病毒粒子尤其識別且遞送其內容物至靶細胞。

【0311】用於自野生型病毒研發人造病毒粒子之技術為熟習此項技術者所熟知。作為遞送媒劑之已知人造病毒粒子包括基於反轉錄病毒之此等者(參見例如WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; 美國專利第5,219,740號; WO 93/11230; WO 93/10218; 美國專利第4,777,127號; GB專利第2,200,651號; EP 0 345 242; 及WO 91/02805)、 α 病毒(例如辛得比斯病毒載體、勝利基森林病毒(Semliki forest virus) (ATCC VR-67; ATCC VR-1247)、羅斯河病毒(Ross River virus) (ATCC VR-373; ATCC VR-1246)、委內瑞拉馬腦炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus) (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532))及腺相關病毒(參見例如WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984及WO 95/00655)。

【0312】一般而言, 人造病毒粒子藉由將外源識別蛋白插入至病毒粒子中, 藉由重組技術經常置換天然識別蛋白來構築。外源識別蛋白可為例如抗體、受體、配位體或膠原蛋白結合域。本發明提供在正常生理條件

下結合至細胞失活或活性降低且在異常條件下結合至細胞為活性或活性提高的條件活性識別蛋白。基於位點處存在異常條件，條件活性識別蛋白可藉此優先結合至患病組織及/或疾病位點處之靶細胞且避免或僅最低限度地結合至存在正常生理條件之正常組織細胞。條件活性識別蛋白可表現及呈現於病毒粒子表面上。

【0313】在一些實施例中，本發明提供一種進化親本或野生型識別蛋白質且篩選條件活性識別蛋白之方法。條件活性識別蛋白與親本或野生型識別蛋白相比在正常生理條件下結合至細胞之活性更低，且與親本或野生型識別蛋白相比在異常條件下結合至細胞之活性更高。此類條件活性識別蛋白可藉由眾所周知的重組技術插入病毒粒子中以產生條件活性病毒粒子。

【0314】在另一實施例中，本發明提供一種包括條件活性識別蛋白之條件活性病毒粒子，其允許條件活性病毒粒子識別且結合患病組織或疾病位點處之靶細胞，而非正常組織之細胞。此類條件活性病毒粒子可將病毒粒子內之治療劑優先遞送至疾病組織或疾病位點，而條件活性病毒粒子將較少遞送或不遞送治療劑至正常組織細胞。

【0315】在一些實施例中，相較於健康或未罹患特定疾病或疾病病狀之身體其他部分中之pH或溫度，疾病位點處之靶細胞在具有異常pH (例如pH 6.5)或異常溫度之區域或微環境內部。在此實施例中，條件活性識別蛋白與親本或野生型識別蛋白相比在正常生理pH或溫度下與靶細胞之靶蛋白結合之活性更低，且與親本或野生型識別蛋白相比在異常pH或溫度下與靶細胞之靶蛋白結合之活性更高。以此方式，識別蛋白將優先結合於遇到異常pH或溫度之位點處，藉此將治療遞送至疾病位點。

【0316】在一個實施例中，病毒粒子可包括本發明之條件活性抗體，且尤其抗體之可變區(例如Fab、Fab'、Fv)。此類條件活性抗體可與親本或野生型抗體相比在正常組織位置處可能遇到之正常生理條件下以更低親和力及與親本或野生型抗體相比在疾病位點或患病組織處可能遇到之異常條件下以更高親和力結合至靶細胞之靶蛋白(呈抗原形式)。根據本發明之方法，條件活性抗體可來源於親本或野生型抗體。

【0317】在一個實施例中，靶細胞上之靶蛋白包括酪胺酸激酶生長因子受體，其在例如多種腫瘤中於細胞表面上過度表現。例示性酪胺酸激酶生長因子為VEGF受體、FGF受體、PDGF受體、IGF受體、EGF受體、TGF- α 受體、TGF- β 受體、HB-EGF受體、ErbB2受體、ErbB3受體及ErbB4受體。

條件活性DNA/RNA修飾蛋白質

【0318】DNA/RNA修飾蛋白質已發現為新基因組工程改造工具之形式，尤其一種稱作CRISPR，其可允許研究人員對基因進行顯微手術，準確且容易改變染色體上精確位置處之DNA序列(基因組編輯，Mali等人，「Cas9 as a versatile tool for engineering biology」, *Nature Methods*, 第10卷, 第957頁至第963頁, 2013)。舉例而言，鎌狀細胞貧血起因於單一鹼基突變，其可潛在地使用DNA/RNA修飾蛋白質校正。該技術可準確刪除或編輯染色體位元，甚至藉由改變單一鹼基對(Makarova等人，「Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems」, *Nature Reviews Microbiology*, 第9卷, 第467頁至第477頁, 2011)。

【0319】利用CRISPR之基因組編輯具有快速且同時使細胞產生多個基因變化之能力。包括心臟病、糖尿病及神經疾病之多種人類疾病受多種

基因中之突變影響。此基於CRISPR之技術具有逆轉致病突變且治癒此等疾病或至少減輕此等疾病嚴重程度之可能性。基因組編輯依賴於相關CRISPR (Cas)蛋白質(酶家族)以便切割基因組DNA。典型地，Cas蛋白藉由較小引導RNA引導至基因組中之靶向區域，其中引導RNA匹配靶區域。因為Cas蛋白具有很少或沒有序列特異性，所以引導RNA用作Cas蛋白之指針以實現精確基因組編輯。在一個實施例中，一種Cas蛋白可與多個引導RNA一起使用以同時糾正多個基因突變。

【0320】存在多種Cas蛋白。實例包括Cas1、Cas2、Cas3'、Cas3''、Cas4、Cas5、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3及Csf4 ((Makarova等人, 「Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems」, *Nature Reviews Microbiology*,第9卷,第467頁至第477頁, 2011)。

【0321】為了進行基因組編輯，Cas蛋白必須進入靶細胞。個體中之細胞可在細胞內部具有不同細胞內pH。患病組織中的一些細胞具有異常細胞內pH。舉例而言，一些腫瘤細胞往往會具有約7.12-7.65之鹼性細胞內pH，而正常組織中之細胞具有6.99-7.20範圍內之中性細胞內pH。參見Cardone等人, 「The role of disturbed pH dynamics and the Na(+)/H(+) exchanger in metastasis」, *Nat. Rev. Cancer*,第5卷,第786頁至第795頁, 2005。在慢性低氧中，患病組織中之細胞具有約7.2-7.5之細胞內pH，亦

高於正常組織之細胞內pH (Rios等人, 「Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na^+/H^+ exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells」, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 第289卷,第L867頁至第L874頁, 2005)。另外, 在局部缺血細胞中, 細胞內pH典型地在6.55至6.65範圍內, 其低於正常組織之細胞內pH (Haqberg, 「Intracellular pH during ischemia in skeletal muscle: relationship to membrane potential, extracellular pH, tissue lactic acid and ATP」, *Pflugers Arch.*, 第404卷,第342頁至第347頁, 1985)。患病組織中之異常細胞內pH之更多實例論述於Han等人, 「Fluorescent Indicators for Intracellular pH」, *Chem Rev.*,第110卷,第2709頁至第2728頁, 2010中。

【0322】本發明提供一種自親本或野生型Cas蛋白產生條件活性Cas蛋白之方法, 其中條件活性Cas蛋白具有以下中之至少一者: (1)相對於親本或野生型Cas蛋白之活性在正常細胞內部之正常生理條件下降低的酶活性, 及(2)相對於親本或野生型Cas蛋白之活性在靶細胞, 諸如上文所論述之患病細胞中之一者內部之異常條件下提高的酶活性。在一些實施例中, 正常生理條件為約中性細胞內pH, 且異常條件為高於或低於中性之不同細胞內pH。在一個實施例中, 異常條件為7.2至7.65之細胞內pH或6.5-6.8之細胞內pH。

【0323】在一些實施例中, 條件活性Cas蛋白可使用本發明之條件活性病毒粒子遞送至靶細胞。條件活性病毒粒子包括條件活性Cas蛋白及至少一種用於將Cas蛋白引導至Cas蛋白將編輯基因組DNA之位置處之引導RNA。

【0324】多特異性抗體在含有所有或大部分多特異性抗體可結合至之標靶(抗原)之優先靶向組織處具有高選擇性。舉例而言，相較於可表現抗原中僅一者之非靶細胞，雙特異性抗體藉由向表現雙特異性抗體識別之抗原兩者之靶細胞呈現更大優先權而提供針對靶細胞之選擇性。因此，歸因於系統動態性，與處於平衡下之非靶細胞相比存在更多結合至靶細胞之雙特異性抗體。

【0325】本文中經工程改造之多特異性抗體或其抗原識別片段可用作本發明之嵌合抗原受體中之ASTR。

工程改造細胞毒性細胞

【0326】在藉由篩選步驟鑑別條件活性ASTR後，可藉由接合編碼個別域之聚核苷酸序列組裝嵌合抗原受體以形成單一聚核苷酸序列(CAR基因，其編碼條件活性CAR)。個別域包括條件活性ASTR、TM及ISD。在一些實施例中，其他域亦可引入在CAR中，包括ab ESD及CSD (圖1)。若條件活性CAR為雙特異性CAR，則CAR基因可例如以N端至C端方向在以下結構中：N端信號序列-ASTR 1-連接子-ASTR 2-細胞外間隔子域-跨膜域-協同刺激域-細胞內信號傳導域。在一個實施例中，此類CAR基因可包括兩種或多於兩種協同刺激域。

【0327】替代地，編碼條件活性CAR之聚核苷酸序列可以N端至C端方向在以下結構中：N端信號序列-ASTR 1-連接子-ASTR 2-跨膜域-協同刺激域-細胞內信號傳導域。在一個實施例中，此類CAR可包括兩個或多於兩個協同刺激域。若CAR包括超過兩個ASTR，則編碼CAR之聚核苷酸序列可以N端至C端方向在以下結構中：N端信號序列-ASTR 1-連接子-ASTR 2-連接子-(抗原特異性靶向區)_n-跨膜域-協同刺激域-細胞內信號傳

導域。此類CAR可進一步包括細胞外間隔子域。各ASTR可藉由連接子分離。在一個實施例中，此類CAR可包括兩個或多於兩個協同刺激域。

【0328】條件活性CAR藉由表現載體引入至細胞毒性細胞中。本文亦提供包括編碼本發明之條件活性CAR之聚核苷酸序列的表現載體。適合的表現載體包括慢病毒載體、 γ 反轉錄病毒載體、泡沫病毒載體、腺相關病毒(AAV)載體、腺病毒載體、經工程改造之混雜病毒、裸DNA，包括(但不限於)轉座子介導之載體，諸如Sleeping Beauty、Piggybak及Integrases，諸如Phi31。一些其他適合的表現載體包括單純疱疹病毒(HSV)及反轉錄病毒表現載體。

【0329】腺病毒表現載體係基於腺病毒，其具有整合至基因組DNA中之低容量，但轉染宿主細胞之高效率。腺病毒表現載體含有足以實現以下之腺病毒序列：(a)支持表現載體封裝及(b)最終表現宿主細胞中之CAR基因。腺病毒基因組為36 kb線性雙股DNA，其中可插入外源DNA序列(諸如CAR基因)以代入大碎片腺病毒DNA，從而製得本發明之表現載體(Grunhaus及Horwitz, 「Adenoviruses as cloning vectors」, *Seminars Virol.*, 第3卷,第237頁至第252頁, 1992)。

【0330】其他表現載體係基於腺相關病毒，其利用腺病毒偶合系統。此AAV表現載體具有高頻率整合至宿主基因組中。其可甚至感染未分裂細胞，因此使其適用於將基因遞送至哺乳動物細胞中，例如組織培養物中或活體內。AAV載體具有感染性之較寬宿主範圍。關於產生及使用AAV載體之細節描述於美國專利第5,139,941號及第4,797,368號中。

【0331】反轉錄病毒表現載體能夠整合至宿主基因組中，遞送大量外源基因物質，感染廣泛範圍之物種及細胞類型且封裝在特定細胞株中。

反轉錄病毒載體藉由將核酸(例如編碼CAR之一者)插入至某些位置處病毒基因組中構築以產生複製缺陷型病毒。儘管反轉錄病毒載體能夠感染廣泛多種細胞類型，但CAR基因之整合及穩定表現需要分裂宿主細胞。

【0332】慢病毒載體來源於慢病毒，其為除常見反轉錄病毒基因gag、pol及env外之複合物反轉錄病毒，含有具有調節性或結構性功能之其他基因(美國專利第6,013,516號及第5,994,136號)。慢病毒之一些實例包括人類免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2)及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。慢病毒載體已藉由多次緩解HIV毒性基因產生，例如基因env、vif、vpr、vpu及nef缺失使得載體生物安全。慢病毒載體能夠感染非分裂細胞且可用於活體內及離體基因轉移兩者及CAR基因表現(美國專利第5,994,136號)。

【0333】包括條件活性CAR基因之表現載體可藉由熟習此項技術者已知的任何手段引入至宿主細胞中。表現載體必要時可包括用於轉染之病毒序列。替代地，表現載體可藉由融合、電穿孔、基因槍、轉染、脂質體轉染或其類似者引入。宿主細胞可在培養物中生長及擴增，之後引入表現載體，繼而用於引入及整合載體之適當的處理。宿主細胞隨後擴增且藉助於載體中存在之標記物進行篩選。可使用之各種標記物包括hprt、耐新黴素性、胸苷激酶、耐潮黴素性等。如本文所使用，術語「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用。在一些實施例中，宿主細胞為T細胞、NK細胞及NKT細胞。

【0334】在另一態樣中，本發明亦提供包括且穩定地表現本發明之條件活性CAR之經基因工程改造之細胞毒性細胞。在一個實施例中，經基因工程改造之細胞包括T淋巴球(T細胞)、原始T細胞(T_N)、記憶T細胞(例如中樞記憶T細胞(TC_M)、效應子記憶細胞(T_{EM}))、自然殺手細胞及能夠產

生治療學上相關後代之巨噬細胞。在另一實施例中，經基因工程改造之細胞為自體細胞。適合的T細胞之實例包括 $CD4^+/CD8^-$ 、 $CD4^-/CD8^+$ 、 $CD4^-/CD8^-$ 或 $CD4^+/CD8^+$ T細胞。T細胞可為 $CD4^+/CD8^-$ 及 $CD4^-/CD8^+$ 細胞之混合群體或單一殖株群體。當與表現靶抗原之細胞(例如 $CD20^+$ 及/或 $CD19^+$ 腫瘤細胞)活體外共培養時，本發明之 $CD4^+$ T細胞亦可產生IL-2、IFN- γ 、TNF- α 及其他T細胞效應子細胞介素。本發明之 $CD8^+$ T細胞可溶解表現靶抗原之細胞。在一些實施例中，T細胞可為 $CD45RA^+ CD62L^+$ 原初細胞、 $CD45RO CD62L^+$ 中心記憶細胞、 $CD62L^-$ 效應子記憶細胞或其組合中之任一者或多者(Berger等人，「Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity」, *Curr. Opin. Immunol.*, 第21卷, 第224頁至第232頁, 2009)。

【0335】經基因工程改造之細胞毒性細胞可藉由用包括本發明之CAR基因之表現載體穩定轉染宿主細胞產生。使用表現載體基因工程改造細胞毒性細胞之額外方法包括化學轉化方法(例如使用磷酸鈣、樹狀體、脂質體及/或陽離子聚合物)、非化學轉化方法(例如電穿孔、光學轉化、基因電轉移及/或流體動力學遞送)及/或基於粒子之方法(例如刺穿感染，使用基因槍及/或磁轉染)。經轉染之細胞表明存在單一整合未重新配置載體且可離體擴增表現條件活性CAR。

【0336】用於將表現載體引入至宿主細胞中之物理方法包括磷酸鈣沈澱、脂質體轉染、粒子轟擊、顯微注射、電穿孔及其類似者。用於產生包括載體及/或外源性核酸之細胞之方法為此項技術中熟知的。參見例如 Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。將表現載體引入至宿主細胞中之

化學方式包括膠態分散系統，諸如大分子複合物、奈米膠囊、微球、珠粒及基於脂質之系統，包括水包油乳液、微胞、混合微胞及脂質體。

【0337】在含有CAR基因之表現載體引入至宿主細胞中之後，將表現CAR基因，因此產生可結合至靶抗原之CAR分子。所產生之CAR分子藉助於具有跨膜域成為跨膜蛋白。宿主細胞將隨後轉化成CAR細胞，諸如CAR-T細胞。用於產生具有CAR分子之經工程改造之細胞毒性細胞，例如CAR-T細胞之方法已描述於例如(Cartellieri等人, 「Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer」, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 第2010卷,文章ID 956304, 2010；及Ma等人, 「Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells」, PNAS, 第113卷,E450-E458, 2016)中。

【0338】無論在細胞毒性細胞之基因改造以表現所需條件活性CAR之前或之後，可使用如例如美國專利第6,352,694號；第6,534,055號；第6,905,680號；第6,692,964號；第5,858,358號；第6,887,466號；第6,905,681號；第7,144,575號；第7,067,318號；第7,172,869號；第7,232,566號；第7,175,843號；第5,883,223號；第6,905,874號；第6,797,514號；第6,867,041號；及US 20060121005中所描述之方法使細胞活化及數目擴增。舉例而言，本發明之T細胞可藉由與表面接觸來擴增，該表面連接有刺激CD3/TCR複合物相關信號的藥劑及刺激T細胞表面上之協同刺激分子的配位體。特定言之，T細胞群體可藉由與抗CD3抗體或其抗原結合片段，或固定於表面上之抗CD2抗體接觸，或藉由同與鈣離子載體結合之蛋白激酶C活化劑(例如苔蘚蟲素)接觸而刺激。為了協同刺激T細胞表面上之輔助分子，使用結合輔助分子之配位體。舉例而言，可

使T細胞與抗CD3抗體及抗CD28抗體在適於刺激T細胞增殖之條件下接觸。為了刺激CD4⁺ T細胞或CD8⁺ T細胞增殖，抗CD3抗體及抗CD28抗體。抗CD28抗體之實例包括9.3、B-T3、XR-CD28 (Diaclone, Besançon, France)，可如此項技術中通常已知之其他方法一般使用(Berg等人, *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998；Haanen等人, *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328, 1999；Garland等人, *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63, 1999)。

【0339】在各種實施例中，本發明提供包括醫藥學上可接受之賦形劑及治療有效量之本發明之條件活性CAR的醫藥組合物。組合物中之條件活性CAR可為編碼CAR之聚核苷酸、包括CAR之蛋白質或表現CAR蛋白質之經基因改造之細胞中之任一者或多者。CAR蛋白質可呈醫藥學上可接受之鹽形式。醫藥學上可接受之鹽係指可用作醫藥工業中之治療蛋白鹽之鹽，包括例如鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽及其類似鹽；及普魯卡因、二苯甲基胺、乙二胺、乙醇胺、甲基葡糖胺、牛磺酸及其類似者之胺鹽；以及酸加成鹽，諸如鹽酸鹽及鹼性胺基酸及其類似者。

【0340】醫藥學上可接受之賦形劑可包括適用於製備通常安全、無毒且合意的醫藥組合物之賦形劑，且包括對於獸用以及人類醫藥用途可接受之賦形劑。此類賦形劑可為固體、液體、半固體，或者在氣霧劑組合物情況下為氣態。賦形劑之一種類型包括醫藥學上可接受之載劑，其可添加以增強或穩定化組合物，或以促進組合物之製備。液體載劑包括糖漿、花生油、橄欖油、甘油、生理食鹽水、醇類及水。固體載劑包括澱粉、乳糖、硫酸鈣、二水合物、白土、硬脂酸鎂或硬脂酸、滑石、果膠、阿拉伯膠(acacia)、瓊脂及明膠。載劑亦可包括單獨或與蠟一起的持續釋放材

料，諸如單硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

【0341】醫藥學上可接受之載劑部分藉由所投與之特定組合物以及藉由投與組合物使用之特定方法決定。因此，存在本發明之醫藥組合物之多種適合調配物。可使用多種水性載劑，例如緩衝鹽水及其類似者。此等溶液為無菌的且一般不含非所需物質。此等組合物可藉由習知熟知滅菌技術滅菌。組合物可含有醫藥學上可接受之輔助物質，如大致生理條件所需要，諸如pH調節劑及緩衝劑、毒性調節劑及其類似者，例如乙酸钠、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、乳酸鈉及其類似者。此等調配物中之CAR之濃度可廣泛改變，且將主要基於液體體積、黏度及體重，根據所選之特定投與模式及患者需求進行選擇。

【0342】在各種實施例中，根據本發明之醫藥組合物可調配用於經由任何適合的投與途徑遞送。「投與途徑」可指代此項技術中已知之任何投與路徑，包括(但不限於)氣霧劑、經鼻、經口、靜脈內、肌肉內、腹膜內、吸入、經黏膜、經皮、非經腸、可植入泵、連續輸注、局部應用、膠囊及/或注射。

【0343】根據本發明之醫藥組合物可在用於經口投與之乳液或糖漿中進行囊封、製錠或製備。遵循涉及以下之習知藥學技術製備醫藥組合物：對於錠劑形式，涉及研磨、混合、造粒及必要時之壓縮；或對於硬明膠膠囊形式，涉及研磨、混合及填充。當使用液體載劑時，製劑可呈糖漿、酏劑、乳液或水性或非水性懸浮液形式。此類液體調配物可直接經口投與或填充至軟明膠膠囊中。

【0344】醫藥組合物可調配為：(a)液體溶液，諸如懸浮於稀釋劑，諸如水、生理鹽水或PEG 400中之有效量之封裝核酸；(b)膠囊、藥囊或

錠劑，各自含有預定量之活性成份，呈液體、固體、顆粒劑或明膠形式；
(c)適當的液體中之懸浮液；及(d)適合的乳液。特定言之，適合的劑型包括(但不限於)錠劑、丸劑、散劑、糖衣藥丸、膠囊、液體、口含劑、凝膠、糖漿、漿液、懸浮液等。

【0345】固體調配物包括適合的固體賦形劑，諸如碳水化合物或蛋白質填充劑，包括例如糖，諸如乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇；來自玉米、小麥、水稻、馬鈴薯或其他植物之澱粉；纖維素，諸如甲基纖維素、羥基丙基甲基纖維素及羧基甲基纖維素鈉；及樹膠，包括阿拉伯膠及黃蓍；及蛋白質，例如明膠及膠原蛋白。可添加崩解劑或增溶劑，諸如交聯聚乙烯吡咯啉酮、瓊脂、褐藻酸或其鹽，諸如海藻酸鈉。錠劑形式可包括以下中之一或多者：乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、磷酸鈣、玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、黃蓍、微晶纖維素、阿拉伯膠、明膠、膠態二氧化矽、十字纖維素鈉、滑石、硬脂酸鎂、硬脂酸及其他賦形劑、著色劑、填充劑、黏合劑、稀釋劑、緩衝劑、濕潤劑、防腐劑、調味劑、染料、崩解劑及醫藥學上可接受之載劑。

【0346】液體懸浮液包括與適合於製造水性懸浮液之賦形劑摻合之條件活性CAR。此類賦形劑包括懸浮劑，諸如羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、褐藻酸鈉、聚乙烯吡咯啉酮、黃蓍膠及阿拉伯膠；及分散劑或濕潤劑，諸如天然存在之磷脂(例如卵磷脂)、環氧烷與脂肪酸(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)之縮合產物、環氧乙烷與長鏈脂族醇(例如十七仲乙基氧基十六醇)之縮合產物、環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己醣醇之部分酯(例如聚氧化乙烯山梨糖醇單油酸酯)之縮合產物或環氧乙烷與衍生自脂肪酸及己醣醇酸酐(例如聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯)之部分

酯之縮合產物。液體懸浮液亦可含有一或多種防腐劑，諸如對羥基苯甲酸乙酯或對羥基苯甲酸正丙酯；一或多種著色劑；一或多種調味劑；及一或多種甜味劑，諸如蔗糖、阿斯巴甜糖或糖精。可針對重量莫耳滲透濃度調節調配物。

【0347】口含錠形式可包括調味劑，通常蔗糖及阿拉伯膠或黃耆中之活性成分，以及片劑，其在惰性基質(諸如明膠及甘油，或蔗糖及阿拉伯膠、乳液、凝膠及其類似物)中包括活性成分，該惰性基質除了含有活性成分以外，亦含有此項技術中已知之載劑。認識到，當經口投與時，條件活性CAR必須保護不被消化。此典型地藉由將條件活性CAR與組合物複合以賦予其對酸性及酶促水解具有抵抗性或藉由將條件活性CAR封裝在適當抵抗性載劑，諸如脂質體中實現。保護蛋白質不被消化之手段為此項技術中眾所周知的。醫藥組合物可囊封於例如脂質體中，或提供活性成份之緩慢釋放之調配物中。

【0348】醫藥組合物可調配為氣霧劑調配物(例如其可「霧化」)以便經由吸入投與。可將氣霧劑調配物放置於諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮氣及其類似物之可接受之加壓推進劑中。用於直腸投與之適合的調配物包括例如栓劑，其由封裝核酸與栓劑基質組成。適合的栓劑基質包括天然或合成三酸甘油酯或石蠟烴，另外，亦有可能使用由封裝核酸與基質(包括例如液體三酸甘油酯、聚乙二醇及石蠟烴)之組合組成之明膠直腸膠囊。

【0349】醫藥組合物可調配用於非經腸投與，諸如藉由關節內(在關節中)、靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內及皮下途徑，包括水性及非水性等張無菌注射劑溶液，其可含有賦予用預期受體血液等張之調配物之抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑及溶質，及水性及非水性無菌懸浮液，其可包括懸

浮劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑及防腐劑，在本發明之實施中，組合物可例如藉由靜脈內輸注、經口、體表、腹膜內、膀胱內或鞘內投與。在一個態樣中，腸胃外投與模式為投與包括CAR蛋白質或經基因工程改造之細胞毒性細胞之組合物之較佳方法。組合物可適宜地以單位劑型投與且可藉由醫藥領域中眾所周知的方法中之任一者製備，例如如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. Easton Pa.,第18版, 1990中所描述。用於靜脈內投與之調配物可含有醫藥學上可接受之載劑，諸如無菌水或生理鹽水，聚伸烷二醇，諸如聚乙二醇、植物油、氫化萘及其類似者。

【0350】可藉由選自以下之至少一種模式投與醫藥組合物：非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、推注、經陰道、經直腸、經口頰、舌下、鼻內及經皮。該方法可視情況進一步包括在條件活性CAR之前、同時或之後投與包括有效量之選自以下中之至少一者的至少一種化合物或蛋白質之至少一種組合物：可偵測標記或報導子、TNF拮抗劑、抗風濕劑、肌肉弛緩劑、麻醉劑、非類固醇抗炎藥(NSAK))、止痛劑、麻醉劑、鎮靜劑、局部麻醉劑、肌神經阻斷劑、抗菌劑、抗牛皮癬劑、皮質類固醇、同化類固醇、紅血球生成素、免疫、免疫球蛋白、免疫抑制、生長激素、激素替代藥物、放射性藥品、抗抑鬱劑、抗精神病藥、刺激劑、哮喘藥物治療、 β 促效劑、吸入類固醇、腎上腺素或其類似物、細胞毒性或其他抗癌劑、抗代謝物(諸如甲胺喋呤)或抗增生

劑。

【0351】待用經基因工程改造之細胞毒性細胞或本發明之醫藥組合物治療之癌症類型包括癌瘤、母細胞瘤及肉瘤及某些白血病或淋巴惡性疾病、良性及惡性腫瘤及惡性病，例如肉瘤、癌瘤及黑色素瘤。癌症可為非實體腫瘤(諸如血液腫瘤)或實體腫瘤。亦包括成年人腫瘤/癌症及兒科腫瘤/癌症。

【0352】血液癌為血液或骨髓之癌症。血液(或血性)癌之實例包括白血病，包括急性白血病(如急性淋巴球性白血病、急性骨髓細胞性白血病、急性骨髓性白血病及骨髓母細胞性、前髓細胞性、骨髓單核細胞性、單核細胞性及紅白血病)、慢性白血病(如慢性骨髓細胞性(粒細胞性)白血病、慢性骨髓性白血病及慢性淋巴球性白血病)、真性紅血球增多症、淋巴瘤、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)、非霍奇金氏淋巴瘤(頑固性及高級形式)、多發性骨髓瘤、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重鏈病、骨髓發育不良症候群、毛細胞白血病及骨髓發育不良。

【0353】實體腫瘤為通常不含有囊腫或液體區域之異常組織塊體。實體腫瘤可為良性或惡性的。不同類型的實體腫瘤根據形成其之細胞類型命名(諸如肉瘤、癌瘤及淋巴瘤)。實體腫瘤(諸如肉瘤及癌瘤)之實例包括纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肉瘤、軟骨肉瘤、骨肉瘤及其他肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏腫瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌瘤、淋巴惡性腫瘤、胰臟癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝細胞癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲狀腺髓樣癌、乳頭狀甲狀腺癌、嗜鉻細胞瘤皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、髓性癌、支氣管

癌、腎細胞癌、肝癌、膽管癌、絨膜癌、威耳姆士腫瘤(Wilms' tumor)、子宮頸癌、睪丸腫瘤、精原細胞瘤、氣囊癌、黑素瘤及CNS腫瘤(如神經膠瘤(如腦幹神經膠瘤及混合神經膠質瘤)、神經膠母細胞瘤(亦稱為多形性膠質母細胞瘤)星形細胞瘤、CNS淋巴瘤、胚細胞瘤、神經管胚細胞瘤、神經鞘瘤顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、神經母細胞瘤、視網膜母細胞瘤及腦轉移瘤)。

【0354】本發明亦提供一種醫療裝置，其包括至少一種CAR蛋白質、編碼CAR之聚核苷酸序列或表現CAR之宿主細胞，其中該裝置適合於藉由選自以下之至少一種模式投與至少一種條件活性CAR：非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、推注、經陰道、經直腸、經口頰、舌下、鼻內或經皮。

【0355】在另一態樣中，本發明提供一種套組，其在第一容器中包括呈凍乾形式之至少一種CAR蛋白質、編碼CAR之聚核苷酸序列或表現CAR之宿主細胞，及視情況選用之第二容器，包括無菌水、無菌緩衝水或至少一種選自由以下組成之群的防腐劑：苯酚、間甲酚、對甲酚、鄰甲酚、氯甲酚、苯甲醇、苯汞基亞硝酸酯、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化鎂、對羥基苯甲酸烷基酯、苯紮氯銨、苧索氯銨、脫氫乙酸鈉及硫柳汞或其在水性稀釋劑中之混合物。在一個態樣中，在該套組中，第一容器中之條件活性CAR或特定部分或變異體之濃度復原至具有第二容器之內容物

之約0.1 mg/ml至約500 mg/ml之濃度。在另一態樣中，該第二容器進一步包括等張劑。在另一態樣中，第二容器進一步包括生理學上可接受之緩衝液。在一個態樣中，本發明提供一種治療至少一種野生型蛋白質介導之病況之方法，其包括向需要其之患者投與提供於套組中且在投與之前復原的調配物。

【0356】亦提供一種用於人類醫藥或診斷用途之製品，其包括封裝材料及包括至少一種CAR蛋白質之溶液或凍乾形式的容器、編碼CAR之聚核苷酸序列或表現CAR之宿主細胞。該製品可視情況包括具有容器作為非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、推注、經陰道、經直腸、經口頰、舌下、鼻內或經皮遞送裝置或系統之組分。

【0357】在一些實施例中，本發明提供一種包括檢索來自個體之細胞毒性細胞、藉由將本發明之CAR基因引入至細胞毒性細胞中來基因工程改造細胞毒性細胞及向該個體投與經基因工程改造之細胞毒性的方法。在一些實施例中，細胞毒性細胞選自T細胞、原初T細胞、記憶T細胞、效應T細胞、自然殺手細胞及巨噬細胞。在一個實施例中，細胞毒性細胞為T細胞。

【0358】在一個實施例中，T細胞獲自個體。T細胞可獲自許多來源，包括周邊血液單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染位點之組織、腹水、肋膜積液、脾組織及腫瘤。在本發明之某些實施例中，可使用此項技術中可用之多種T細胞株。在本發明之某些實施例

中，T細胞可獲自使用熟習此項技術者已知的任何數目之技術，諸如Ficoll™分離自個體收集之血液。

【0359】在一個較佳實施例中，藉由血球分離術獲得來自個體之循環血液的細胞。血球分離術產物典型地含有淋巴細胞，包括T細胞、單核球、粒細胞、B細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。在一個實施例中，藉由血球分離術收集之細胞可經洗滌以移除血漿部分且將細胞置於適當緩衝液或培養基中以用於後續處理步驟。在本發明之一個實施例中，用磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)洗滌細胞。在替代性實施例中，洗滌溶液缺乏鈣且可能缺乏鎂或可能缺乏許多(若並非全部)二價陽離子。再次，出人意料地，在無鈣存在下初始活化步驟導致放大之活化。如一般熟習此項技術者將容易瞭解，洗滌步驟可藉由熟習此項技術者已知的方法實現，諸如藉由根據製造商說明書使用半自動「流通」離心(例如Cobe 2991細胞處理器、Baxter CytoMate或Haemonetics細胞保存器5)。洗滌後，可將細胞再懸浮於多種生物相容性緩衝劑中，諸如不含 Ca^{2+} 、不含 Mg^{2+} 之PBS、PlasmaLyte A或其他具有或不具有生理食鹽水溶液之緩衝液。或者，可移除血球分離術樣本之非所需組分且細胞直接再懸浮於培養基中。

【0360】在另一實施例中，藉由溶解紅血球及例如藉由經由PERCOLL™梯度離心或藉由逆流離心淘析耗盡單核球，自周邊血液淋巴細胞分離T細胞。T細胞之特定亞群(諸如 CD3^+ 、 CD28^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ 、 CD45RA^+ 及 CD45RO^+ T細胞)可藉由正向或負向選擇技術進一步分離。舉例而言，藉由陰性選擇增濃T細胞群體可使用針對陰性選擇之細胞所特有之表面標記物的抗體之組合來實現。一種方法為經由負向磁力免疫黏附或流式細胞術進行的細胞分選及/或選擇，其使用針對負向選擇之細胞上所

存在之細胞表面標記物的單株抗體混合物。為了藉由負選擇增濃CD4⁺細胞，單株抗體混合液典型地包括CD 14、CD20、CD11b、CD 16、HLA-DR及CD8之抗體。在某些實施例中，可能需要增濃或正選擇調節T細胞，其典型地表現CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺及FoxP3⁺。

【0361】舉例而言，在一個實施例中，藉由與抗CD3/抗CD28 (亦即，3×28)-共軛珠粒，諸如DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T一起培育對於正選擇所需T細胞足夠的時間段來分離T細胞。在一個實施例中，該時間段為約30分鐘。在另一實施例中，該時間段在30分鐘至36小時或更長及其間所有整數值範圍內。在另一實施例中，時間段為至少1、2、3、4、5或6小時。在另一較佳實施例中，該時間段為10至24小時。在一個較佳實施例中，培育時間段為24小時。為了自白血病患者分離出T細胞，使用較長培育時間(諸如24小時)可提高細胞產量。在T細胞相較於其他細胞類型而言很少的任何情形下，可以使用較長培育時間分離T細胞，諸如自腫瘤組織或自免疫功能不全個體分離出腫瘤浸潤淋巴球(TIL)。另外，使用較長培育時間可提高捕捉CD8⁺ T細胞之效率。因此，僅僅縮短或延長時間便使T細胞結合至CD3/CD28珠粒，且/或藉由增加或降低珠粒與T細胞比率(如本文進一步描述)，可以在培養起始時或在該方法期間之其他時間點據此優先選擇T細胞亞群。另外，藉由增加或降低珠粒或其他表面上之抗CD3及/或抗CD28抗體比率，可以在培養起始時或在其他所要時間點據此優先選擇T細胞亞群。熟習此項技術者將瞭解本發明情形中亦可使用多個選擇回合。在某些實施例中，可能需要進行選擇程序且在活化及擴增過程中使用「未經選擇之」細胞。「未經選擇之」細胞亦可經受其他多輪選擇。

【0362】所獲得之細胞毒性細胞隨後如本文所描述經基因工程改造。將典型地位於表現載體中之編碼CAR之聚核苷酸引入至細胞毒性細胞中使得細胞毒性細胞將表現(較佳穩定地) CAR。編碼CAR之聚核苷酸典型地整合至細胞毒性細胞宿主基因組中。在一些實施例中，聚核苷酸引入無需導致整合，而實際上僅引入的聚核苷酸之暫時維持性可為足夠的。以此方式，一種可具有短期作用，其中細胞毒性細胞可引入至宿主中，且隨後在預定時間之後，例如在細胞已能夠遷移至特定治療位點之後開啟。

【0363】視細胞毒性細胞及待治療之疾病之性質而定，經基因工程改造之細胞毒性細胞可以廣泛多種方法引入至個體，例如哺乳動物中。經基因工程改造之細胞毒性細胞可引入在腫瘤位點處。在一個實施例中，經基因工程改造之細胞毒性細胞導航至癌症或經改造以導航至癌症。所採用之經基因工程改造之細胞毒性細胞之數目將視多種因素而定，諸如情況、引入目的、細胞生命週期、待使用方案。舉例而言，投與數目、細胞倍增能力及重組構築體穩定性。經基因工程改造之細胞毒性細胞可以在相關位點處或附近注射之分散液形式施加。細胞可在生理學上可接受之培養基中。

【0364】應瞭解，治療方法經受多種變量，諸如CAR之細胞反應、藉由細胞毒性細胞表現CAR之功效及適當時分泌水準、表現的CAR之活性、個體之特定需求，其可隨時間及情況變化，由於缺失經基因工程改造之細胞毒性細胞之細胞活性缺失速率或個別細胞之表現活性及其類似者。因此，預期對於各個別患者，即使存在可向普通群體投與之通用細胞，各患者將監測個體之適當劑量，且監測患者之此類規範此項技術中為常規的。

【0365】以下實例出於對本發明之方法的說明性但非限制性目的。本領域中通常遇到且對於熟習此項技術者明顯之多種條件及參數之其他合適修改及改編均在本發明之範疇內。

實例

實例1：產生針對Axl之scFv條件活性抗體

【0366】針對藥物靶抗原Axl之兩種條件活性單鏈抗體(CAB-scFv-63.9-4及CAB-scFv-63.9-6)表示為具有野生型人類IgG1 Fc、SEQ ID NO: 13或14(產生圖2-3中之二價抗體CAB-scFv-63.9-4-01，SEQ ID NO: 9及CAB-scFv-63.9-6-01，SEQ ID NO: 10)之均二聚體以及產生單價scFv (產生圖2-3中之單價抗體scFv CAB-scFv-63.9-4-02，SEQ ID NO: 11及CAB-scFv-63.9-6-02，SEQ ID NO: 12)之杵-臼系統中之異二聚體。

【0367】藉由ELISA分析量測在pH 6.0及pH 7.4下此等抗體對藥物靶抗原Axl之結合親和力。如圖2中所示，scFv抗體在pH 6.0及pH 7.4下均對藥物靶抗原Axl展示親和力，其與全部二價抗體相當。另外，如圖3中所示，此等scFv抗體在pH 6.0超過pH 7.4下之選擇性亦與全部二價抗體相當。此實例展現本發明之條件活性抗體具有與scFv抗體或全部二價抗體相當之親和力及選擇性。因此，在本發明之CAR-T平台中，本發明之條件活性抗體可作為單一DNA鏈插入編碼CAR之DNA分子中。

實例2：用於構築CAR-T細胞之針對靶抗原Axl之scFv抗體

【0368】根據本發明之一個實施例，藉由同時篩選選擇性及親和力以及在pH 6.0及pH 7.4下之表現量，產生用於藥物靶抗原Axl之條件活性抗體。在血清中使用FLAG標籤進行篩檢，此係因為血清中存在可導致篩檢假陽性之人類抗體。篩選緩衝液為碳酸鹽緩衝液(克雷布斯(krebs)緩衝

液與林格氏標準緩衝液，但與PBS不同)。發現所產生之條件活性抗體在pH 6.0下具有對藥物靶抗原Ax1更高的親和力，但在pH 7.4下具有對相同藥物靶抗原Ax1更低的親和力，兩者均相較於野生型抗體。另外，此等條件活性抗體均具有高表現量，如下表2中所示，其中行「殖株」展示抗體且表現量「mg/ml」顯示於第二行中。

【0369】以所需表現量(「預訂量」，預期表現量)將此等抗體殖株送至服務提供商。然而，此等抗體之實際表現量(「遞送量」)極高且超出預期表現量。

表2.具有高表現量之條件活性抗體

殖株	mg/ml	目標量	獲得量
BAP063.6-hum10F10-FLAG	7	150	294
BAP063.6-HC-H100Y-FLAG	6.6	150	238
BAP063.8-LC046HC04-FLAG	7	200	332.5
BAP063.8-LC062HC02-FLAG	5.8	200	220.4
BAP063.9-13-1-FLAG	5.3	50	123
BAP063.9-29-2-FLAG	4.9	50	102
BAP063.9-45-2-FLAG	5.4	50	129
BAP063.9-13-3-FLAG	5.9	50	130
BAP063.9-21-3-FLAG	5.3	50	117
BAP063.9-21-4-FLAG	7	50	176
BAP063.9-29-4-FLAG	8.2	50	196
BAP063.9-48-3-FLAG	7	50	125
BAP063.9-49-4-FLAG	5.3	50	126
BAP063.9-61-1-FLAG	5.1	50	97
BAP063.9-61-2-FLAG	5	50	92

【0370】使用BAP063.9-13-1抗體作為實例，條件活性抗體不展示緩衝液中之聚集，如圖4中所展現。BAP063.9-13-1抗體藉由尺寸排阻層析分析。在圖4中，僅偵測到一個峰，表明抗體極少或不聚集。

【0371】亦使用表面電漿子共振(SPR)分析條件活性抗體以量測其對藥物靶抗原Ax1之開啟及關閉速率。SPR分析已知量測條件活性抗體之開啟及關閉速率。在碳酸氫鹽存在下進行SPR分析。條件活性抗體之活體內

開啟及關閉速率(在動物及人類中)為條件活性抗體極其重要的特徵。

【0372】觀測到，相較於陰性對照(BAP063 10F10，其在pH 6.0及pH 7.4下具有類似開啟速率)，條件活性抗體在pH 6.0下具有快速開啟速率且在pH 7.4下具有更慢開啟速率(圖5)。另外，將溫度自室溫提高至60℃不會明顯地改變SPR分析結果(圖5)。SPR分析亦展示，相比於pH 7.4，此等條件活性抗體在pH 6.0下選擇性較高(圖6A-6B展示一種抗體作為實例)。

【0373】條件活性生物學抗體概述於表3中。兩種抗體表示為scFv (BAP063.9-13.3及BAP063.9-48.3)，其準備插入CAR-T平台中之CAR中。在60℃下培育抗體一小時不會改變大部分抗體之親和力(「熱穩定性」)。在使用SPR量測在pH 6.0及pH 7.4下之結合活性之兩行報告資料(表3之最後兩行)中，與「BAP063.6-hum10F10-FLAG」(陰性對照，表3中之第二列)進行比較。此等抗體之選擇性可藉由最後兩行資料之間的差異測定。兩種scFv抗體具有極高選擇性(在pH 6下75%及50%，在pH 7.4下超過0%)。

表3-條件活性抗體之概述

菌株	CAB scFv	mg/ml	預訂 量	遞送 量	聚集 (PBS， pH 7.4)	熱穩定 性(60℃ 1小時)	在熱處理之後 在pH 7.4下提 高的結合	Ka [M-s]	Kd[s ⁻¹]	KD[M] pH6.0	pH 6.0 SPR活 性	SPR活 性pH 7.4
BAF063.6-hum10F10-FLAG		7	150	294	否	100%	否	5.14E+06	8.38E-04	1.63E-10	100%	100%
BAF063.6-HC-H100Y-FLAG		6.6	150	238	N.D.			2.41E+06	5.12E-03	2.12E-09	80%	40%
BAF063.9-13-1-FLAG		5.3	50	123	否	100%	是	1.98E+06	2.88E-03	1.46E-09	100%	75%
BAF063.9-29-2-FLAG		4.9	50	102	否	100%	是	1.19E+06	2.14E-03	1.79E-09	90%	50%
BAF063.9-45-2-FLAG		5.4	50	129	否	降低	是	1.53E+06	2.31E-03	1.51E-09	75%	25%
BAF063.9-13-3-FLAG	是	5.9	50	130	否	100%	是	1.42E+06	1.82E-03	1.28E-09	75%	0%
BAF063.9-21-3-FLAG		5.3	50	117	否	100%	否	1.53E+06	4.13E-03	2.69E-09	50%	25%
BAF063.9-21-4-FLAG		7	50	176	否	100%	否	1.03E+06	3.26E-03	3.16E-09	50%	0%
BAF063.9-29-4-FLAG		8.2	50	196	否	100%	(是)	1.40E+06	2.21E-03	1.58E-09	75%	0%
BAF063.9-43-3-FLAG	是	7	50	125	<5%	降低	否	8.92E+05	2.33E-03	2.61E-09	50%	0%

比較實例A：具有針對靶抗原Ax1之非條件活性抗體之CAR-T細胞

【0374】針對靶抗原Ax1之非條件活性scFv抗體用於構築結合至靶抗原Ax1之CAR-T細胞或表現細胞表面上靶抗原Ax1之CHO細胞(CHO-Ax1)，圖7A-7B。非條件活性抗體用作插入T細胞中以構築可結合至靶抗原Ax1之CAR-T細胞之CAR分子之ASTR。

【0375】作為比較，不會表現靶抗原Ax1之CHO細胞經以下處理：(1)未經CAR分子轉導之T細胞，(2)經不結合至靶抗原Ax1之CAR分子轉導之T細胞，及(3)經具有針對靶抗原Ax1之非條件活性抗體之CAR分子轉導之T細胞(圖7A)。藉由細胞指數(圖7A中之Y軸)指示CHO細胞群體，其中細胞指數降低指示CAR-T細胞之細胞毒性(細胞殺傷)。

【0376】參看圖7A，在添加T細胞之前，CHO細胞展示生長。在添加結合至靶抗原Ax1之CAR-T細胞之後，細胞指數起初減少，指示T細胞之非特異性細胞毒性。然而，CHO細胞其後不久恢復生長。更重要的是，三個處理之差異不顯著，指示不會表現具有針對靶抗原Ax1之非條件活性抗體之CAR-T細胞之靶抗原Ax1的CHO細胞無顯著細胞毒性。

【0377】表現靶抗原Ax1之CHO細胞隨後以與上文相同之方式經以下處理：(1)未經CAR分子轉導之T細胞，(2)經不結合至靶抗原Ax1之CAR分子轉導之T細胞，及(3)經具有針對靶抗原Ax1之非條件活性抗體之CAR分子轉導之T細胞(圖7B)。在添加T細胞之後，藉由用具有針對靶抗原Ax1之非條件活性抗體處理CAR-T細胞，但未藉由其他兩種處理，細胞指數明顯地減少，指示藉由具有針對靶抗原Ax1之非條件活性抗體之CAR-T細胞表現靶抗原Ax1之CHO-X1細胞之細胞毒性。

實例3：具有針對靶抗原Ax1之條件活性scFv抗體之CAR-T細胞

【0378】針對靶抗原Ax1之條件活性scFv抗體用於構築CAR分子。T細胞經CAR分子轉導以使得T細胞表現CAR分子(CAR-T細胞)。表現靶抗原Ax1之CHO細胞(CHO-63細胞)或不會表現靶抗原Ax1之常規CHO細胞(CHO細胞)分別經CAR-T細胞處理。未經轉導的T細胞(不具有CAR分子)用作對照物(圖8A-8B)。

【0379】參看圖8A，不會表現靶抗原Ax1之CHO細胞經CAR-T細胞及未經轉導的T細胞處理。兩種處理之間無顯著差異，指示CAR-T細胞對CHO細胞無細胞毒性。參看圖8B，其中表現靶抗原Ax1之CHO細胞(CHO-63)經類似處理，相較於未經轉導的T細胞，具有針對靶抗原Ax1之條件活性抗體之CAR-T細胞明顯地減少CHO-63細胞群體。此指示具有針對靶抗原Ax1之條件活性抗體之CAR-T細胞對CHO-63細胞有細胞毒性。

【0380】在結合至靶抗原Ax1後，CAR-T細胞誘導細胞毒性。此作用藉由量測細胞介素干擾素 γ (INF γ)及IL2之含量得到確認。細胞介素資料顯示於圖9A-9B中。在圖9A中，相較於未經轉導的T細胞，CAR-T細胞與CHO-63細胞上之靶抗原Ax1之結合觸發INF γ 顯著釋放，如觀測到之提高的細胞介素含量所示。類似地，在圖9B中，相較於未經轉導的T細胞，CAR-T細胞與CHO-63細胞上之靶抗原Ax1之結合觸發IL2顯著釋放，如觀測到之提高的細胞介素含量所示。

實例4：具有針對靶抗原ROR2之條件活性scFv抗體之CAR-T細胞

【0381】產生針對靶抗原ROR2之條件活性scFv抗體。其對靶抗原ROR2之結合活性使用ELISA分析來量測(圖10)。

【0382】圖10中所示之scFv抗體中之一者scFv-116101用於構築用於產生CAR-T細胞之CAR分子(116101 CAR-T)。構築的CAR-T細胞用於靶

向表現靶抗原ROR2之道迪細胞。陰性對照為未經CAR分子轉導之T細胞(未經轉導的T細胞)及經不能夠結合至靶抗原ROR2之CAR分子轉導之CAR-T細胞(非ROR2 scFv CAR-T)。結果展示於圖11A中。此等處理中T細胞數目與道迪細胞數目之比率為10:1。具有靶向道迪細胞上靶抗原ROR2之scFv抗體之CAR-T細胞(116101 CAR-T)誘導針對道迪細胞之顯著細胞死亡，如圖11A中更高的死亡/存活細胞比率所示。

【0383】HEK293細胞經與用於處理道迪細胞相同的T細胞處理。結果展示於圖11B中。因為HEK293細胞不會在細胞表面上表現靶抗原ROR2，所以相比於陰性對照，具有靶向靶抗原ROR2之scFv抗體之CAR-T細胞(116101 CAR-T)不會誘導HEK293細胞之顯著細胞死亡(圖11B)。

實例5：實例1至4之具有針對靶抗原Axl及ROR2之抗體之CAR-T細胞之細胞介素釋放

【0384】在此實例中量測藉由CAR-T細胞與靶抗原之結合誘發之細胞介素釋放。圖12A-12B展示在含有針對靶抗原Axl之條件活性scFv抗體之CAR-T細胞與表現靶抗原Axl之CHO-63細胞結合之後的INFg及IL2釋放。在用此等CHO-63細胞處理CAR-T細胞24小時之後，相較於相同CAR-T細胞用於處理不會表現靶抗原Axl之CHO細胞之對照，INFg及IL2細胞介素含量顯著提高，指示INFg及IL2細胞介素釋放。另外，未經不與靶抗原Axl結合之CAR分子及CAR-T細胞轉導之T細胞不會導致INFg及IL2細胞介素顯著釋放。

【0385】圖13A-13B展示在含有針對靶抗原ROR2之條件活性scFv抗體之CAR-T細胞與均表現靶抗原ROR2之拉吉蔔(Rajib)細胞及道迪細胞結合之後的INFg及IL細胞介素含量。在用CAR-T細胞處理拉吉蔔細胞及道

迪細胞24小時之後，相較於相同CAR-T細胞用於處理不會表現靶抗原ROR2之HEK293細胞之對照，觀測到INFg及IL2細胞介素含量顯著提高。另外，未經不與靶抗原ROR2結合之CAR分子及CAR-T細胞轉導之T細胞不會明顯地提高細胞介素含量，藉此指示未能誘導INFg及IL2細胞介素之顯著釋放。

實例6：針對靶抗原CD22之條件活性scFv抗體

【0386】選擇五個針對靶抗原CD22之條件活性scFv抗體。與在pH 7.4下相比，所選條件活性scFv抗體在pH 6.0下活性更高。此等條件活性scFv抗體可用於構築結合至表現靶抗原CD22之細胞之CAR-T細胞。

【0387】然而，應瞭解，儘管已於先前描述中連同本發明之結構及功能之細節一起闡述本發明之許多特徵及優勢，但本發明僅為例示性的，且可詳細地作出改變，尤其關於本發明之原理內之部分之形狀、尺寸及配置，其最大程度地藉由術語之廣泛一般含義所指示，在該等術語中表現所附申請專利範圍。

【序列表】

<110> 美商拜奧亞特拉公司(BioAtla, LLC)
<120> 經改造T細胞之條件活性嵌合抗原受體

<130> BIAT-1014USCIP2

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1437
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 1	
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggcta cgtttttact agctactggc tgcactggat ccgccagccc	120
ccagggaagg ggctggagtg gattggttac attaatccta ggaatgatta tactgagtac	180
aatcggattt tcaaggggag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggg	300
attactacgt tctactgggg ccagggaacg ctggtcaccg tcagctcagg cggcggagga	360
agcggcggtg gatccggagg aggaggctct gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc	420
ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc ctctcctgca agtccagtca aagtgtttta	480
tacagtgcag tggagaagaa ctacttggcc tgggtaccagc agaaacctgg ccaggctccc	540
aggctcctca tctattgggc atccactagg gaaaggggga tcccagacag gttcagtggc	600
agtgggtctg ggacagactt cactctcacc atcagcagac tggagcctga agattttgca	660
gtgtattact gtaagcaata cctctcctcg tggacgttcg gccaagggaac caaggtggaa	720
atcaaacgta cggacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	780
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag acctgaggt caagttcaac	900
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac	960

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1020
aaggagtaca agtgcaaggt cagcaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtca aaggcttcta tcccagcgac	1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagattaca aggatgacga cgataag	1437
<210> 2	
<211> 1437	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成序列	
<400> 2	
gaggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc	60
tcctgcaagg tttctggtta ctcatcact ggcgctacca tgaactggat ccgccagccc	120
ccagggaagg ggctggagtg gattggtctt attaaacctt ccaatgggtg tactagttag	180
aaccagaagt tcaagggcag agtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc acatggtcac	300
tacgagagtt acgaggctat ggactactgg ggccaggga cgctgggtcac cgtcagctca	360
ggcggcgagg gaagcggcgg tggatccgga ggaggaggct ctgacatcca gatgaccag	420
tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg caaggccagt	480
caggatgtgg tttctgctgt agcctggtac cagcagaaac ctggccaggc tcccaggctc	540
ctcatctatt ggcaggatac ccggcacact ggagtcccat caaggttcag cggcagtgga	600
tctgggacag aattcactct caccatcagc agcctgcagc ctgatgattt tgcaacttat	660
tactgtcagg aacatttttag cactccgctc acgttcggcc aagggaacaa ggtggaaatc	720
aaacgtacga cggacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	780
ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	840

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtag 960
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggt cagcaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggta aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagattaca aggatgacga cgataag 1437

<210> 3
<211> 1437
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 3
gaggtccagc tggtagctc tggggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc 60
tcctgcaagg tttctggtta ctattctgg ggcgtacca tgaactggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggtctt attaaacctt ccaatgggtg tactagttag 180
aaccagaagt tcaagggcag agtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc acatggtcac 300
tacgagagtt acgaggctat ggactactgg ggccaggga cgctggtcac cgtcagctca 360
ggcggcggag gaagcggcgg tggatccgga ggaggaggct ctgacatcca gatgaccag 420
tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg caaggccagt 480
caggatgtgg tttctgctgt agcctggtac cagcagaaac ctggccagga tcccaggctc 540
ctcatctatt ggcaggatac ccggcacact ggagtcccat caaggttcag cggcagtgga 600
tctgggacag aattcactct caccatcagc agcctgcagc ctgatgattt tgcaacttat 660
tactgtcagg aacatttttag ccctccgctc acgttcggcc aagggaacaa ggtggaaatc 720

aaacgtacga cggacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggg cagcaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
gagctgacca agaaccaggg cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagattaca aggatgacga cgataag 1437

<210> 4
<211> 1437
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 4
gaggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc 60
tcctgcaagg tttctgggta ctcatcact ggcgctacca tgaactggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggctct attaaacctt ccaatgggtg tactagttac 180
aaccagaagt tcaagggcag agtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc acatgggtcac 300
tacgagagtt acgaggctat ggactactgg ggccaggga cgctgggtcac cgtcagctca 360
ggcggcggag gaagcggcgg tggatccgga ggaggaggct ctgacatcca gatgaccag 420
tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg caaggccagt 480
caggatgtgg tttctgctgt agcctggtac cagcagaaac ctggccagge tcccaggctc 540
ctcatctatt ggcaggatac ccggcacact ggagtcccat caaggttcag cggcagtgga 600

tctgggacag aattcactct caccatcagc agcctgcagc ctgatgattt tgcaacttat	660
tactgtcagg aacatttttag cactccgctc acgttcggcc aagggaacaa ggtggaaatc	720
aaacgtacga cggacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	780
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	840
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	900
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	960
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1020
aaggagtaca agtgcaagggt cagcaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1140
gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc tgccctgggtca aaggcttcta tcccagcgac	1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc accagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagattaca aggatgacga cgataag	1437

<210> 5
<211> 1437
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 5 gaggtccagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc	60
tccctgcaagg tttctgggta ctcatctctgg ggcgctacca tgaactggat ccgccagccc	120
ccagggaagg ggctggagtg gattggctct attaaacctt ccaatgggtg tactagttac	180
aaccagaagt tcaagggcag agtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc acatgggtcac	300
tacgagagtt acgaggctat ggactactgg ggccagggaa cgctgggtcac cgtcagctca	360
ggcggcggag gaagcggcgg tggatccgga ggaggaggct ctgacatcca gatgaccag	420
tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg caaggccagt	480

caggatgtgg tttctgctgt agcctggtac cagcagaaac ctggccaggc tcccaggctc 540
ctcatctatt ggcaggatac ccggcacact ggagtcccat caaggttcag cggcagtgga 600
tctgggacag aattcactct caccatcagc agcctgcagc ctgatgattt tgcaacttat 660
tactgtcagg aacatttttag ccctccgctc acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc 720
aaacgtacga cggacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
cctgaggtca catgctgtgt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgtgttgt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggc cagcaaaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc accagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagattaca aggatgacga cgataag 1437

<210> 6
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 6
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgctgtgtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaagggtc gcaacaaaag cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccagggtca gcctgtactg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 7
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 7
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcggtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaagggtca gcaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccagggtca gcctgtactg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 8
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 8

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Val Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Arg Ile 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 Arg Gly Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser
130 135 140

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

Tyr Ser Ala Val Glu Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Arg
180 185 190

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

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

Ile Lys Arg Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

420

425

430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
465 470 475

<210> 9
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 9

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Ala
20 25 30

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

Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
465 470 475

<210> 10
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 10

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Trp Gly Ala
20 25 30

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

Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
130 135 140

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
145 150 155 160

Gln Asp Val Val Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
165 170 175

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val
180 185 190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
195 200 205

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu
210 215 220

His Phe Ser Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
225 230 235 240

Lys Arg Thr Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

245					250					255					
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
			260					265					270		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		275					280					285			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
	290					295					300				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
305					310					315					320
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				325					330					335	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
			340					345					350		
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
		355					360					365			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
	370					375					380				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
385					390					395					400
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				405					410					415	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
			420					425					430		
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
		435					440					445			
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
	450					455					460				

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
465 470 475

<210> 11
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 11

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Ala
20 25 30

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

Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
130 135 140

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
145 150 155 160

Gln Asp Val Val Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
165 170 175

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val
180 185 190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
195 200 205

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu
210 215 220

His Phe Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
225 230 235 240

Lys Arg Thr Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

370					375					380					
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
385					390					395					400
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				405					410					415	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Thr	Ser
			420					425					430		
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
		435					440					445			
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
	450					455					460				
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	
465					470					475					
<210> 12															
<211> 479															
<212> PRT															
<213> 人工															
<220>															
<223> 合成序列															
<400> 12															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Trp	Gly	Ala
			20					25					30		
Thr	Met	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Leu	Ile	Lys	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr

65				70				75				80				
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	His	Gly	His	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Glu	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
				115					120					125		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	
				130					135					140		
Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	
				145					150					155		
Gln	Asp	Val	Val	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
				165					170					175		
Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Gln	Asp	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	
				180					185					190		
Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	
				195					200					205		
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Glu	
				210					215					220		
His	Phe	Ser	Pro	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	
				225					230					235		
Lys	Arg	Thr	Thr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				245					250					255		
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
				260					265					270		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
				275					280					285		

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
465 470 475

<210> 13
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 合成序列

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195200205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210215220

Pro Gly Lys
225

<210> 14
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 14

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
151015

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
202530

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
354045

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
505560

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65707580

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
859095

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100105110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115120125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130

135

140

Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145150155160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165170175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180185190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195200205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210215220

Pro Gly Lys
225

<210> 15
<211> 481
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成序列

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
151015

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Thr Gly
202530

Tyr Tyr Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp
354045

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Lys Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
505560

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
465 470 475 480

Lys

<210> 16

<211>	1446	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	合成序列	
<400>	16	
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc		60
acctgcactg tctctggcta ctccatcacc actggttatt actggaactg ggtgcgacag		120
gctcgtggac aacgccttga gtggataggt tacataacct acgacggtag caagaactac		180
aacccatctc tcaagaatag agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc		240
ctgaagctga gctctgtgac cgccgcggac acggctgtgt attactgttc gagatttgag		300
ggagtttggt atggtttgga ctactggggc cagggaaacgc tggtcaccgt cagctcaggc		360
ggcggaggaa gcggcggtgg atccggagga ggaggctctg ccatccagtt gacccagtct		420
ccatcctccc tgtctgcatc tgtaggagac agagtcacca tcacttgag agccagtga		480
agtgttgata gatatggcaa tagttttata cactggtatc agcagaaacc agggaaagct		540
cctaagctcc tgatctatcg tacatacaac ctagaatctg ggatcccagc caggttcagt		600
ggcagtggtg ctgggacaga gttcactctc accatcagca gcctgcagtc tgaagatttt		660
gcagtttatt actgtcagca aactaatgag gatccgtgga cgttcggcca agggaccaag		720
gtggaaatca aacgtacgga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc		780
ctgggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc		840
cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaaggtcaag		900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag		960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg		1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtcagc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa		1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc		1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc		1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag		1260
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag		1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcagagge tctgcacaac		1380

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaag attacaagga tgacgacgat	1440
aagtga	1446

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種與Ax1抗原結合之嵌合抗原受體，其包含：

i. 至少一個抗原特異性靶向區，其為具有選自SEQ ID NO:9-12之胺基酸序列的單鏈抗體，且相比於在偏離正常生理pH之異常pH下分析中之抗原特異性靶向區之活性，在正常生理pH下之分析中，具有降低的活性；

ii. 跨膜域，其選自人造疏水性序列及I型跨膜蛋白之跨膜域、T細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137及CD154；及

iii. 細胞內信號傳導域，其選自人類CD3 ζ 鏈之細胞質信號傳導域、Fc γ RIII、Fc ϵ RI、Fc受體之細胞質尾區、帶有基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)之細胞質受體、TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d。

【第2項】

一種與ROR2抗原結合之嵌合抗原受體，其包含：

i. 至少一個抗原特異性靶向區，其為具有選自SEQ ID NO:15之胺基酸序列的單鏈抗體，且相比於在偏離正常生理pH之異常pH下分析中之抗原特異性靶向區之活性，在正常生理pH下之分析中，具有降低的活性；

ii. 跨膜域，其選自人造疏水性序列及I型跨膜蛋白之跨膜域、T細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137

及CD154；及

iii. 細胞內信號傳導域，其選自人類CD3 ζ 鏈之細胞質信號傳導域、Fc γ RIII、Fc ϵ RI、Fc受體之細胞質尾區、帶有基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)之細胞質受體、TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d。

【第3項】

如請求項1至2中任一項之嵌合抗原受體，其中該正常生理pH為哺乳動物個體之血漿中之正常生理pH且該異常pH為腫瘤微環境中之pH。

【第4項】

如請求項3之嵌合抗原受體，其中該正常生理pH在大於7.0至約7.8範圍內。

【第5項】

如請求項4之嵌合抗原受體，其中該正常生理pH在約7.2至約7.6範圍內。

【第6項】

如請求項3之嵌合抗原受體，其中該異常pH在6.0至小於7.0範圍內。

【第7項】

如請求項6之嵌合抗原受體，其中該異常pH在6.0至約6.8範圍內。

【第8項】

如請求項1至2中任一項之嵌合抗原受體，其進一步包含細胞外間隔子域或至少一個協同刺激域。

【第9項】

如請求項8之嵌合抗原受體，其中該細胞外間隔子域選自由以下組成

之群：抗體之Fc片段、抗體之鉸鏈區、抗體之CH2區、抗體之CH3區、人造間隔子序列及其組合。

【第10項】

如請求項1至2中任一項之嵌合抗原受體，其中該至少一個抗原特異性靶向區具有至少約2之在該異常條件下之活性與在該正常生理條件下之相同活性之比率。

【第11項】

如請求項1至2中任一項之嵌合抗原受體，其中該至少一個抗原特異性靶向區包含與連接子連接之兩個抗原特異性靶向區。

【第12項】

如請求項11之嵌合抗原受體，其中該兩個抗原特異性靶向區各自與不同靶抗原或相同靶抗原之不同抗原決定基結合。

【第13項】

如請求項1至2中任一項之嵌合抗原受體，其進一步包含選自由以下組成之群的協同刺激域：TNFR超家族中之蛋白質之協同刺激域、CD28、CD137、CD134、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、LIGHT、NKG2C及B7-H3。

【第14項】

一種表現載體，其包含編碼如請求項1至2中任一項之嵌合抗原受體之聚核苷酸序列。

【第15項】

如請求項14之表現載體，其中該表現載體選自慢病毒載體、 γ 反轉錄

病毒載體、泡沫病毒載體、腺相關病毒載體、腺病毒載體、痘病毒載體、疱疹病毒載體、經工程改造之混雜病毒及轉座子介導之載體。

【第16項】

一種經基因工程改造之細胞毒性細胞，其包含編碼如請求項1至2中任一項之嵌合抗原受體之聚核苷酸序列。

【第17項】

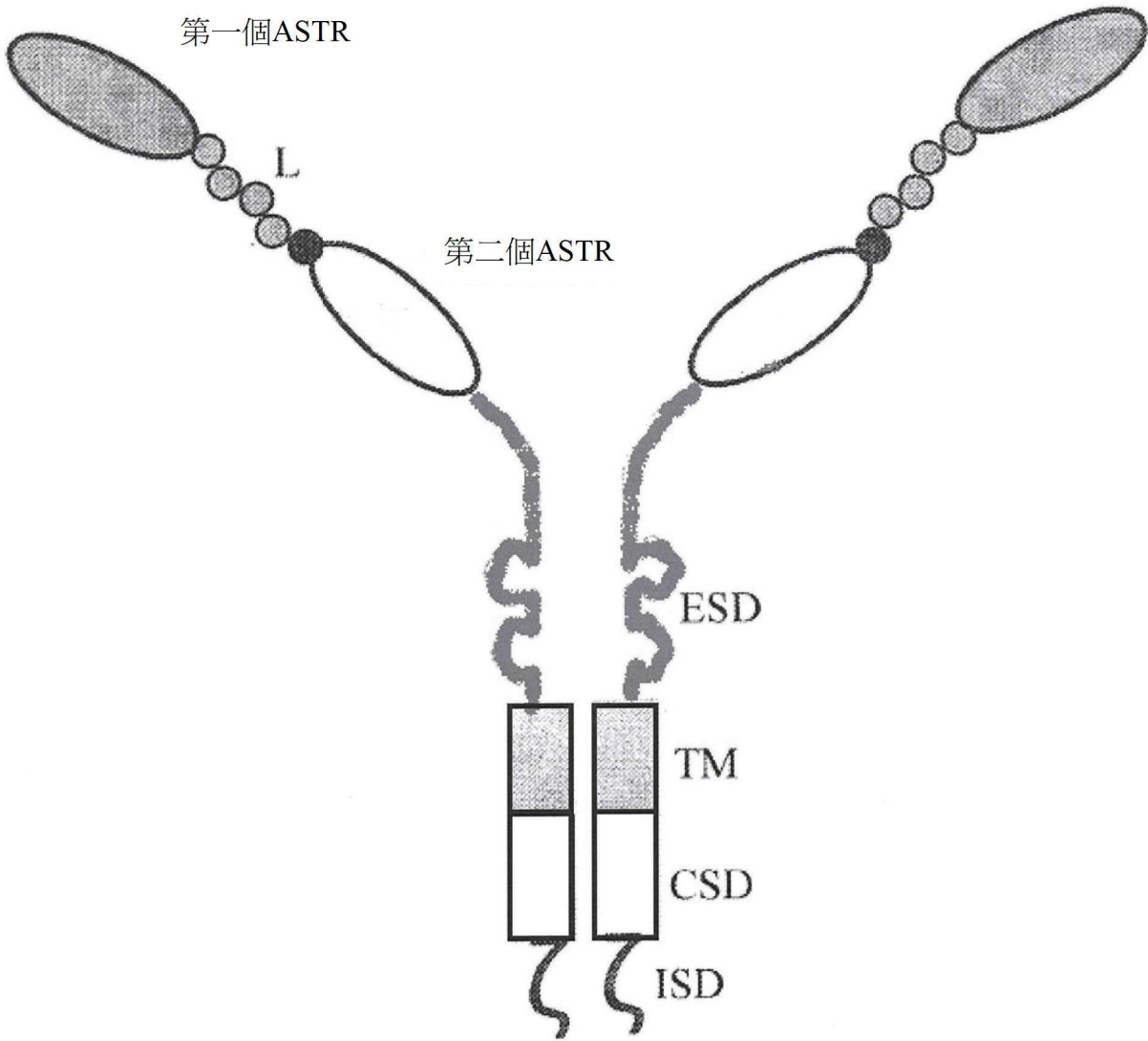
一種用於產生包含至少一個抗原特異性靶向區、跨膜域及細胞內信號傳導域之嵌合抗原受體之方法，該跨膜域選自人造疏水性序列及I型跨膜蛋白之跨膜域、T細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137及CD154，該細胞內信號傳導域選自人類CD3 ζ 鏈之細胞質信號傳導域、Fc γ RIII、Fc ϵ RI、Fc受體之細胞質尾區、帶有基於免疫受體酪氨酸之活化模體(ITAM)之細胞質受體、TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d，該方法包含以下步驟：

自與選自Axl及ROR2之腫瘤特異性靶抗原特異性結合之親本或野生型蛋白質或其域產生該至少一個抗原特異性靶向區，其係藉由：

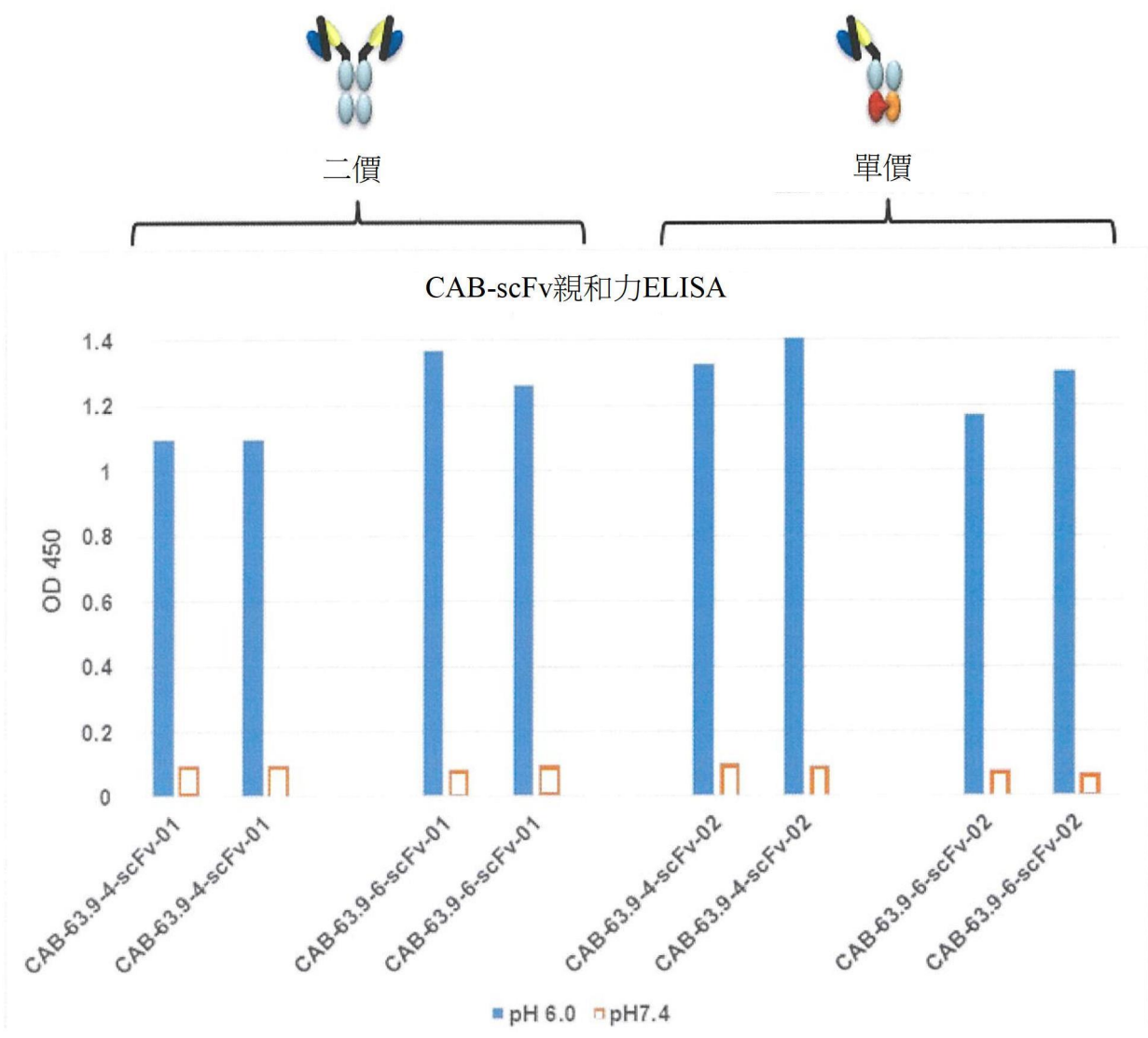
- i. 使用一或多種進化技術使編碼該親本或野生型蛋白質或其域之DNA進化以產生突變DNA；
- ii. 使該等突變DNA表現以獲得突變多肽；
- iii. 使該等突變多肽經受在正常生理pH下之分析及在偏離該正常生理pH之異常pH下之分析；及
- iv. 自步驟(ii)中表現之突變多肽選擇該至少一個抗原特異性靶向

區，其展現相比於在該異常pH下分析中之活性，在該正常生理pH下該分析中之活性降低。

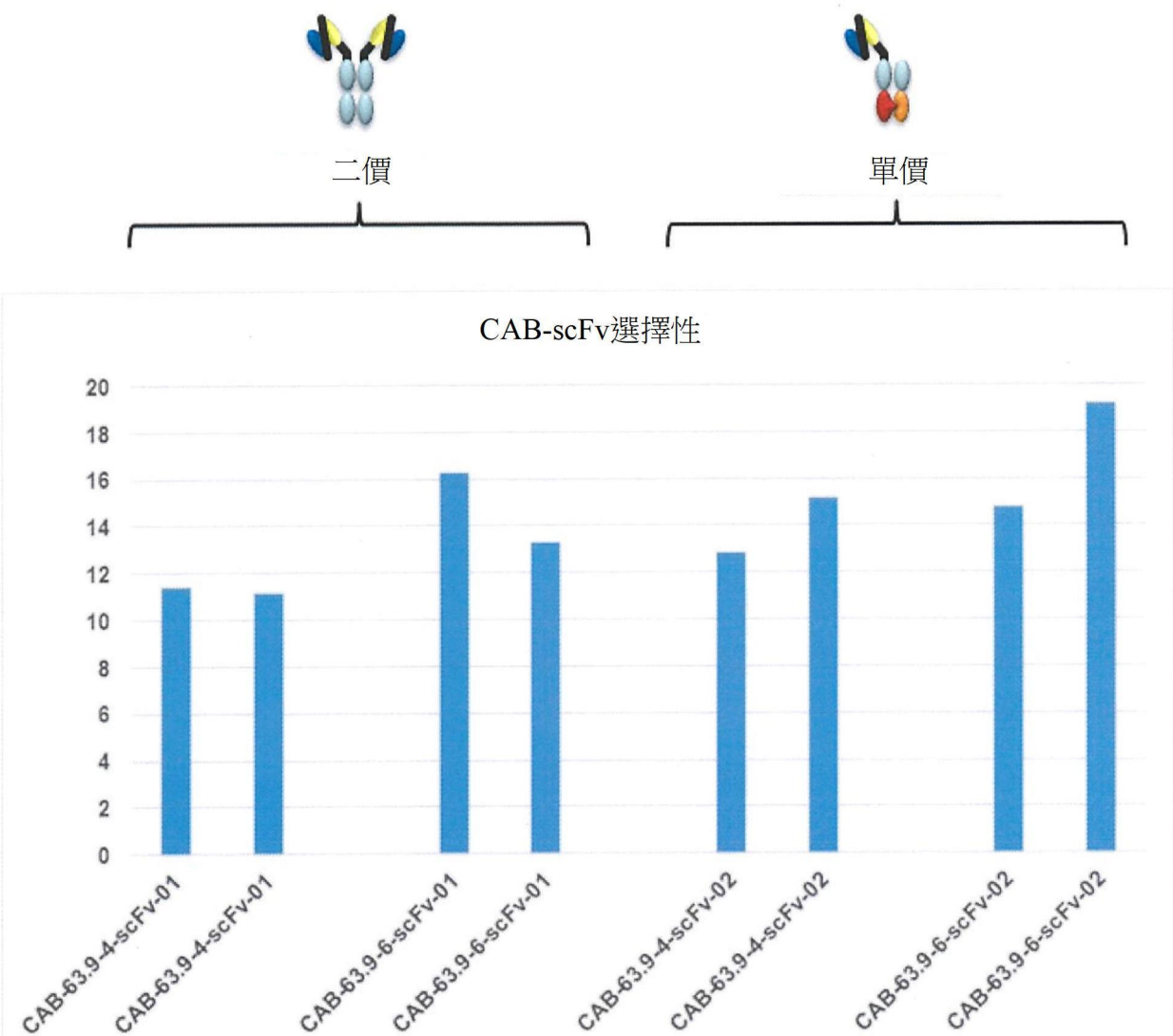
【發明圖式】



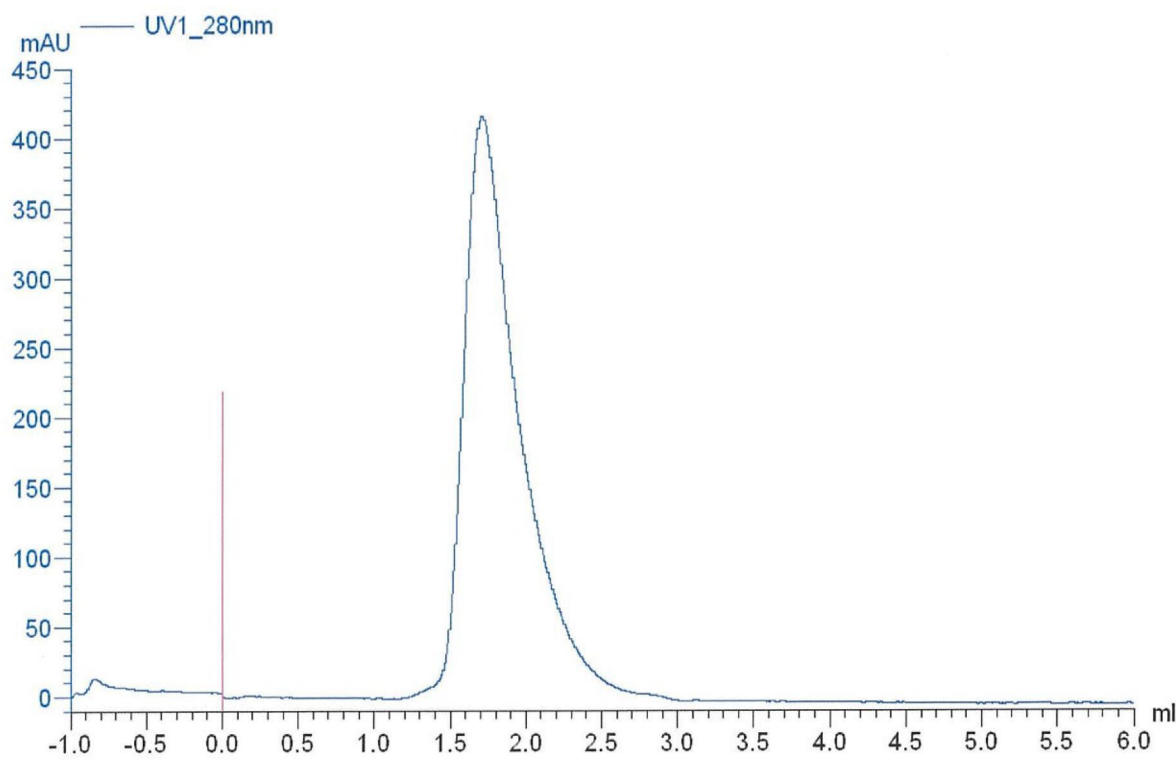
【圖1】



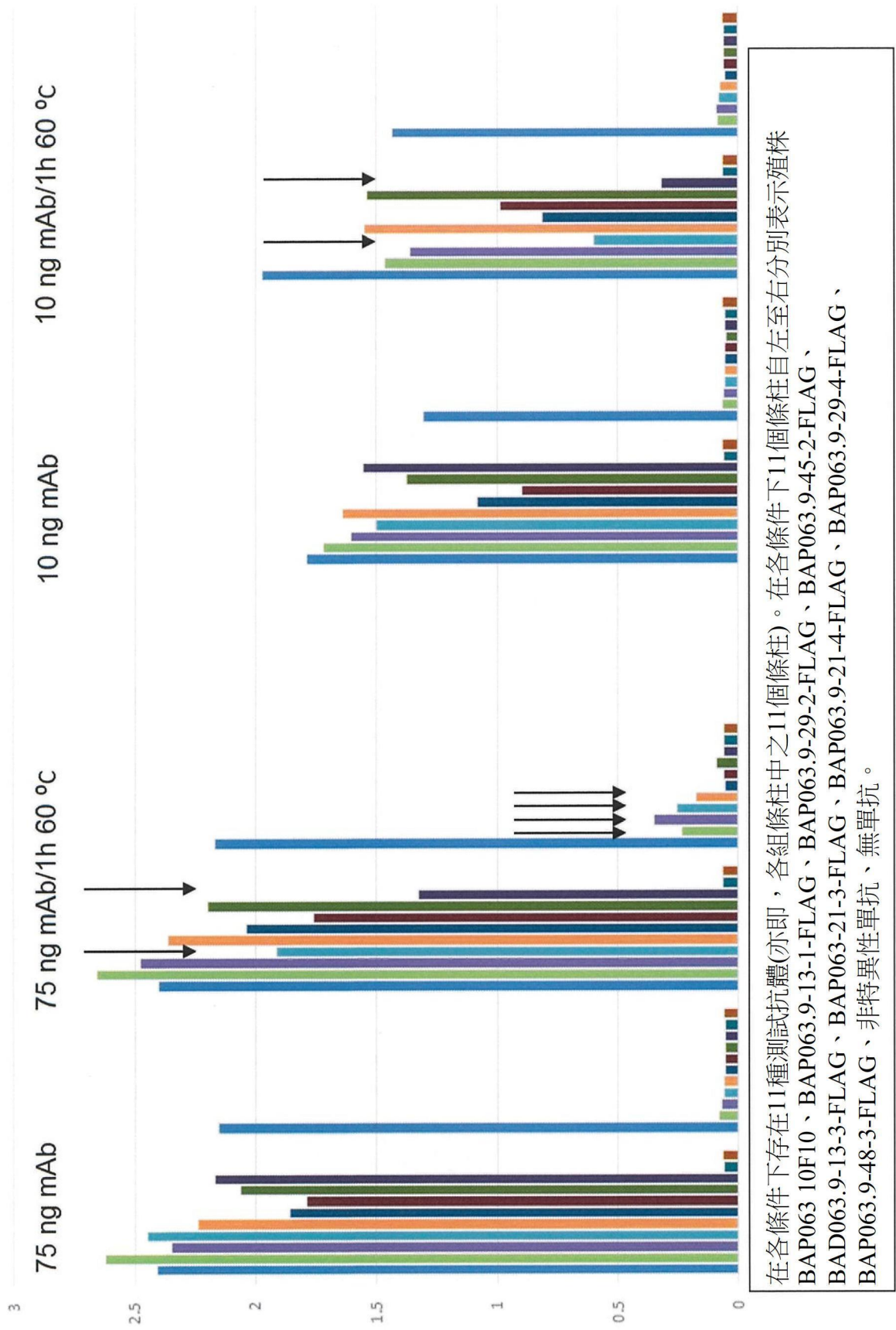
【圖2】



【圖3】

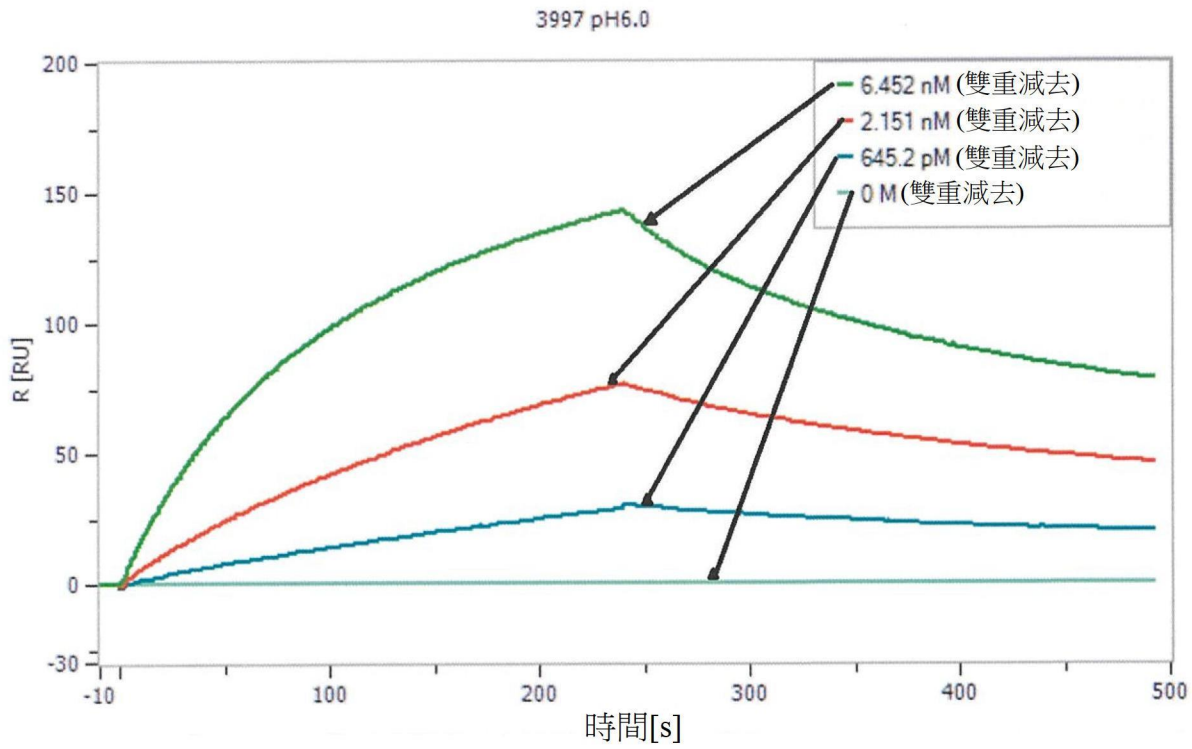


【圖4】

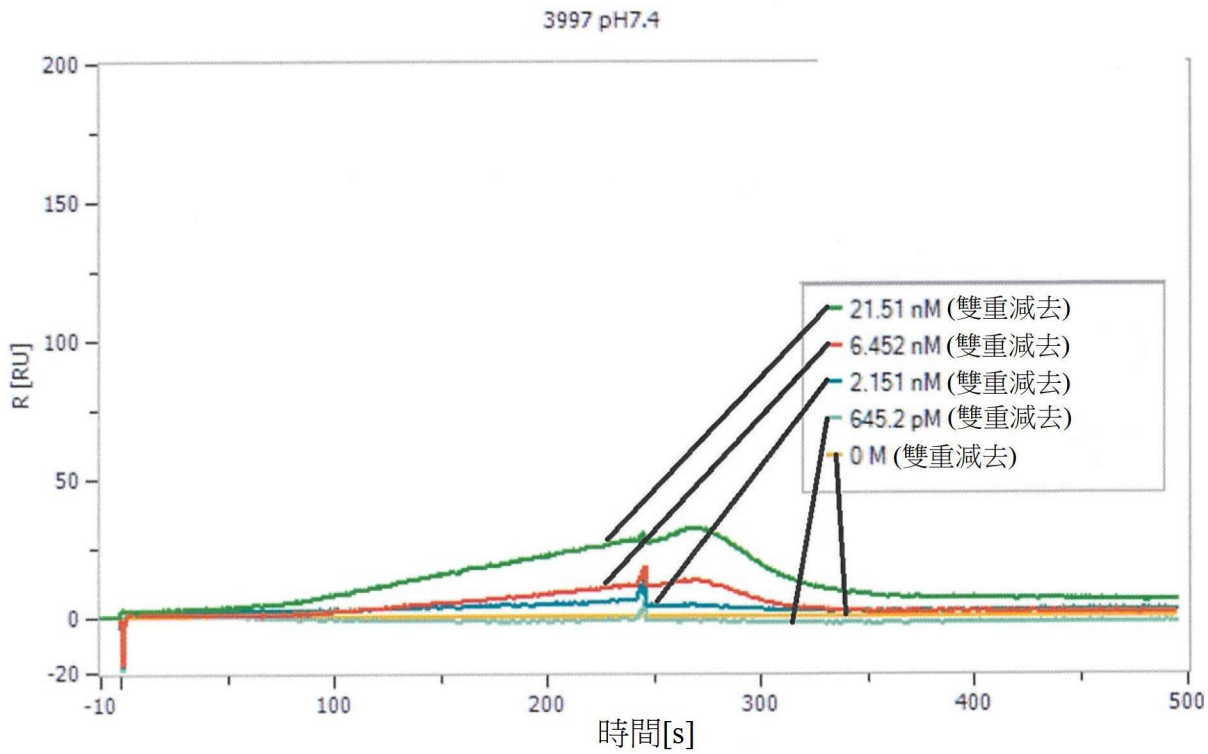


在各條件下存在11種測試抗體(亦即，各組條柱中之11個條柱)。在各條件下11個條柱自左至右分別表示殖株 BAP063 10F10、BAP063.9-13-1-FLAG、BAP063.9-29-2-FLAG、BAP063.9-45-2-FLAG、BAD063.9-13-3-FLAG、BAP063-21-3-FLAG、BAP063.9-21-4-FLAG、BAP063.9-29-4-FLAG、BAP063.9-48-3-FLAG、非特异性單抗、無單抗。

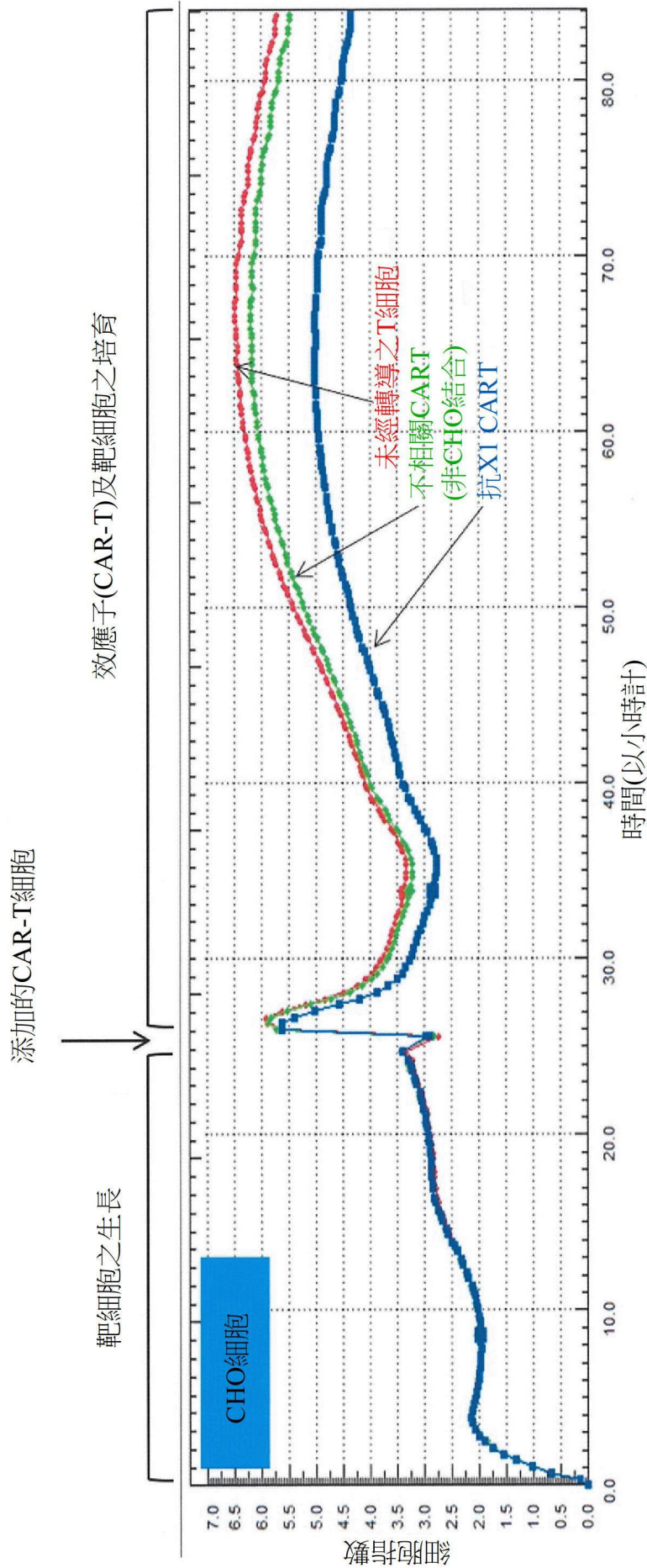
【圖5】



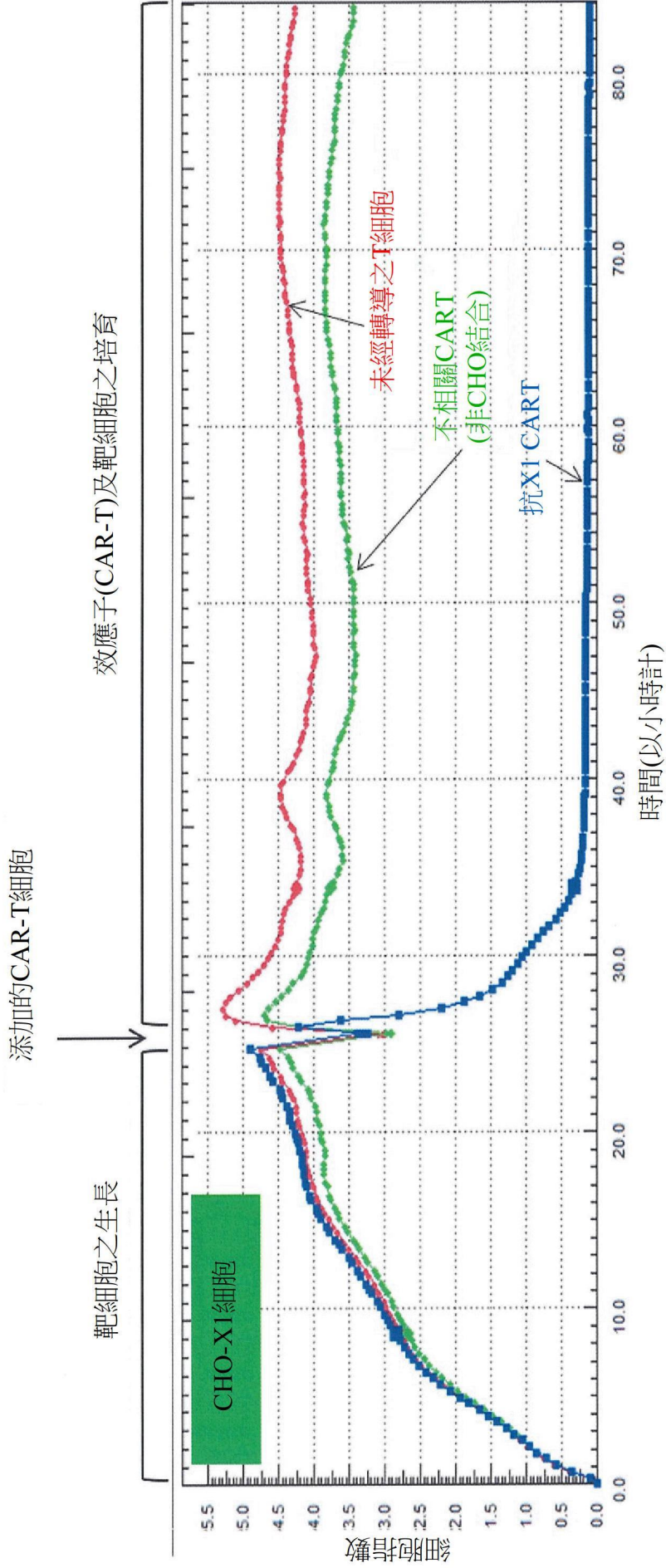
【圖6A】



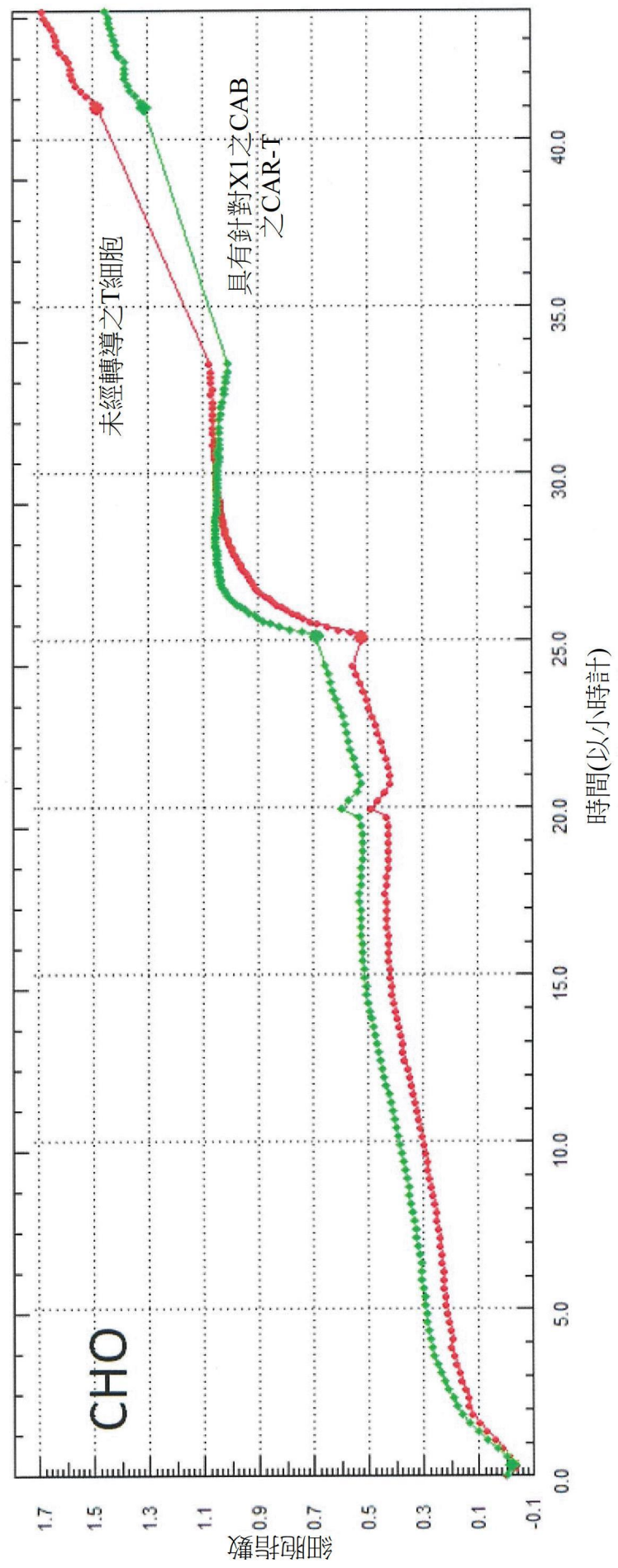
【圖6B】



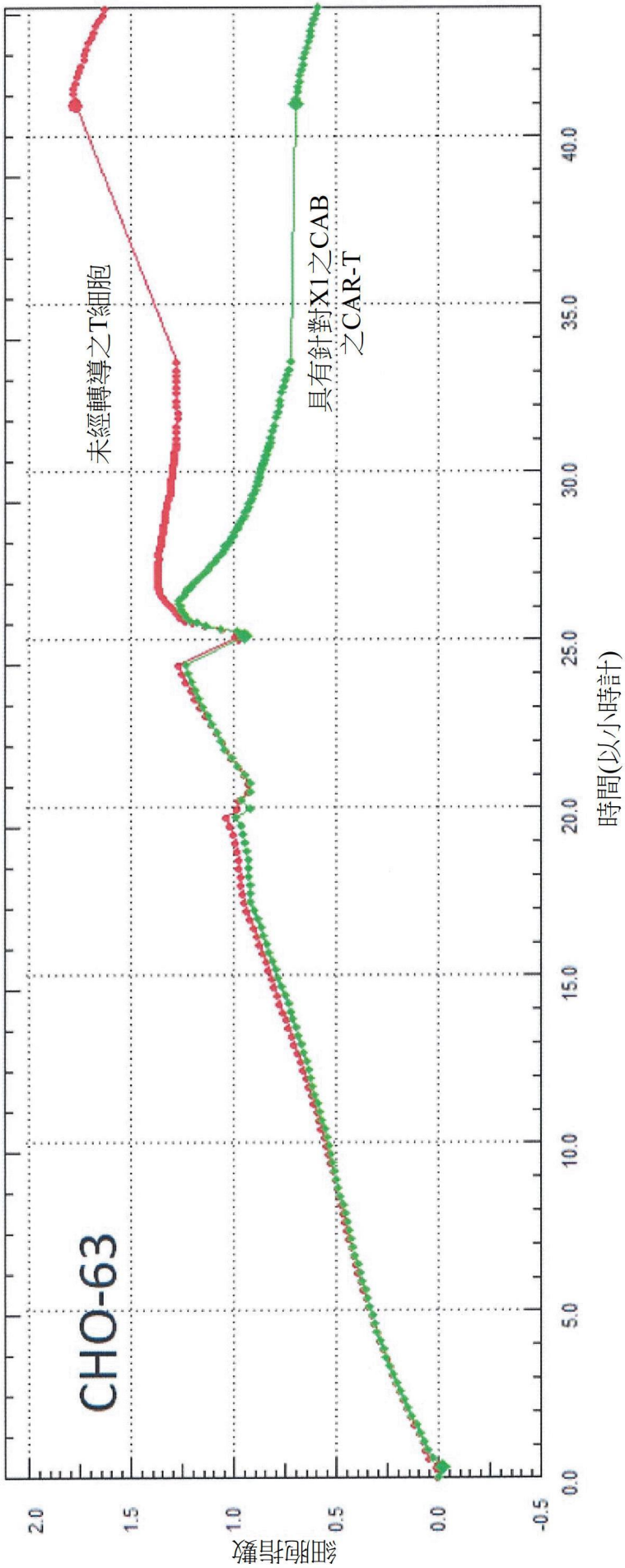
【圖7A】



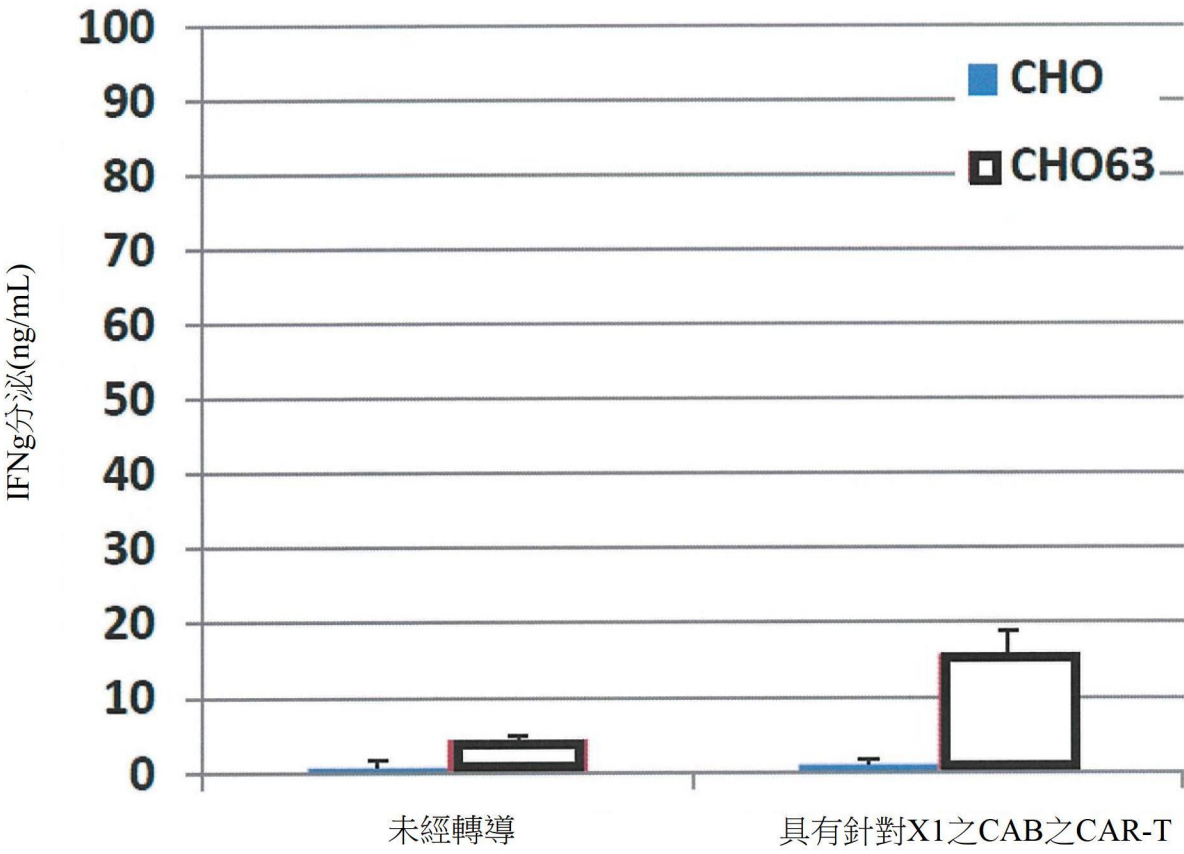
【圖7B】



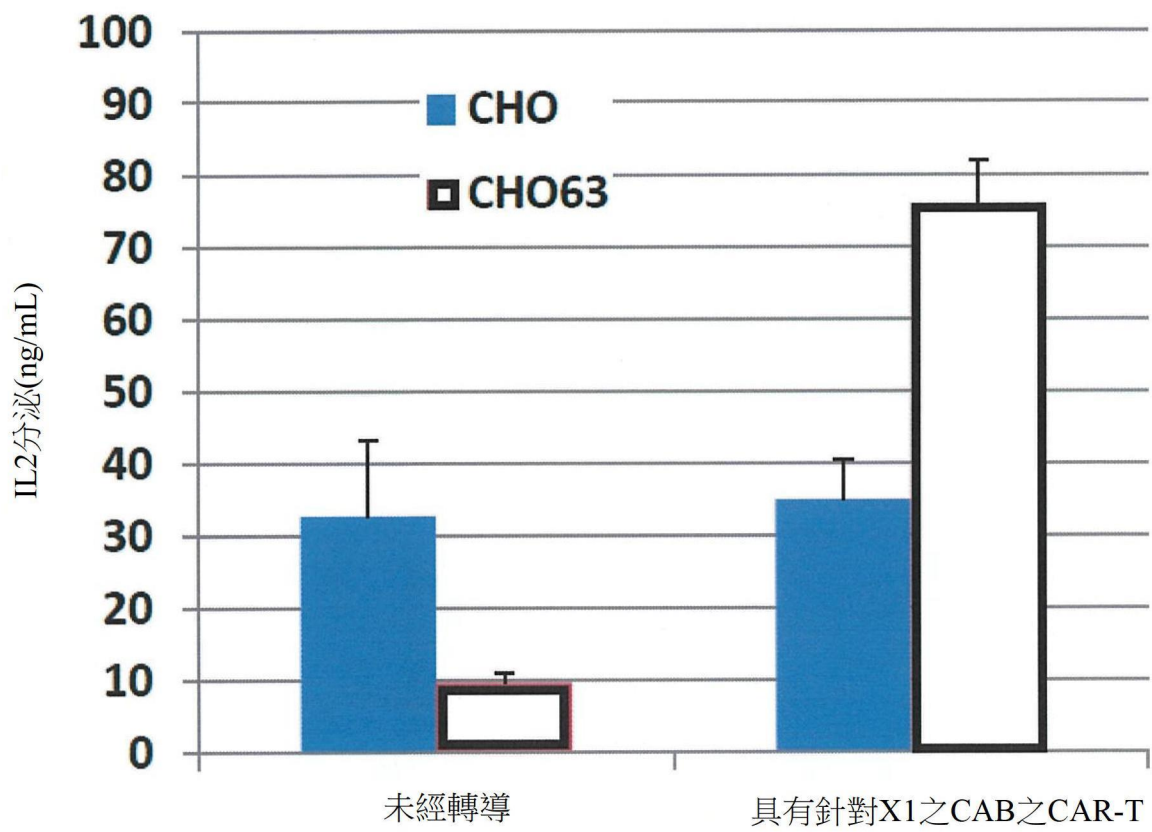
【圖8A】



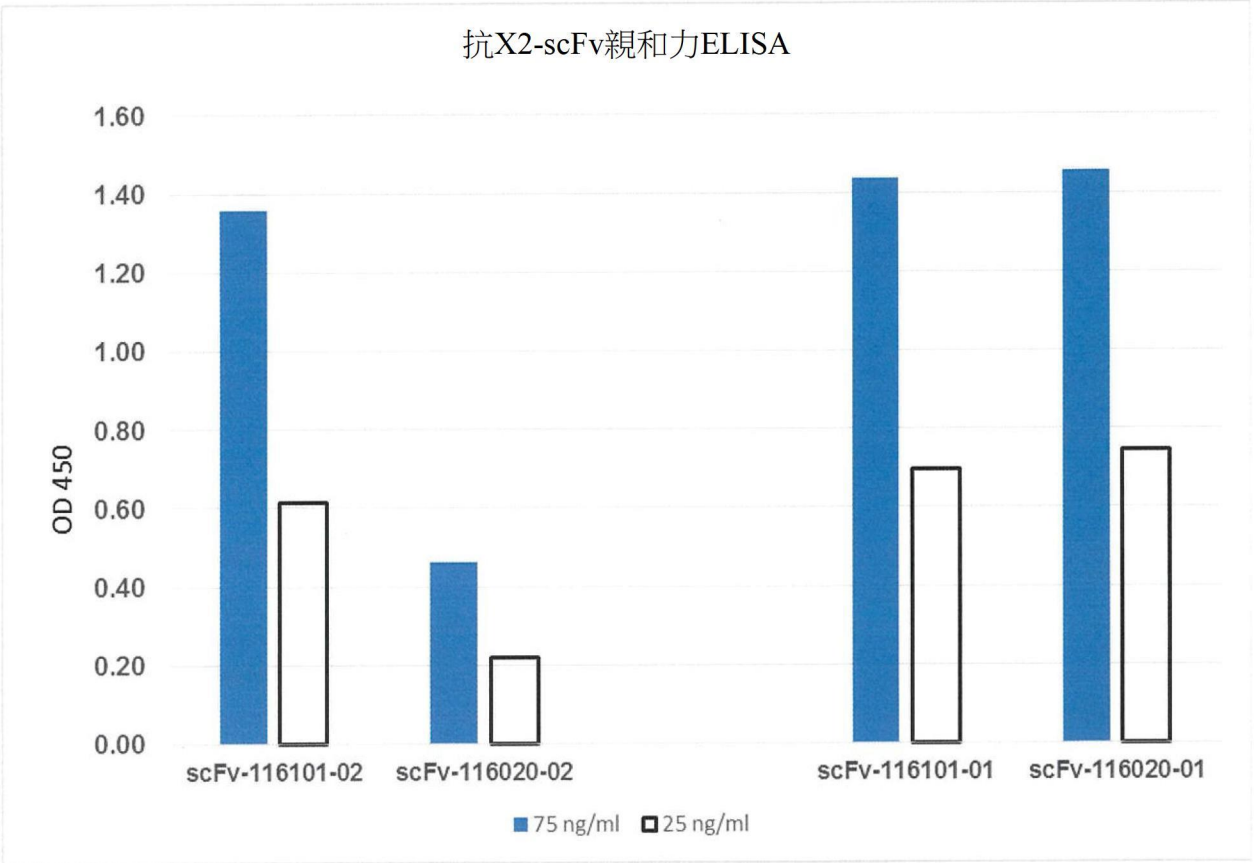
【圖8B】



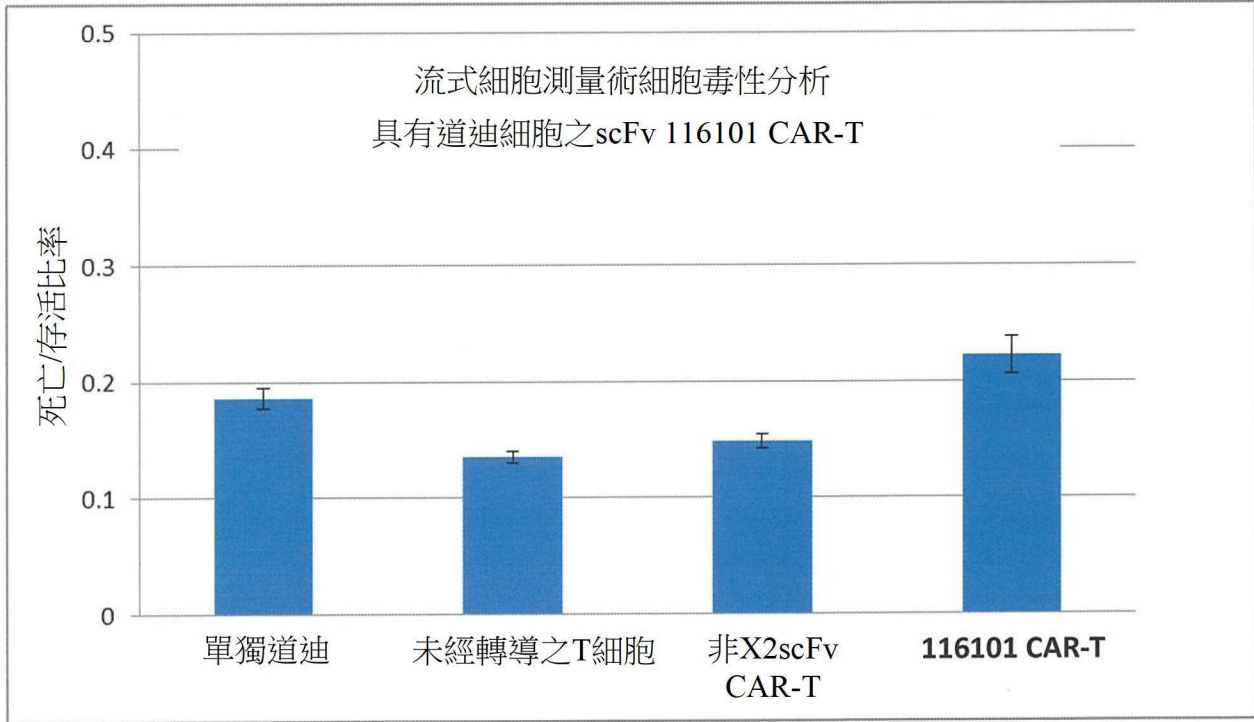
【圖9A】



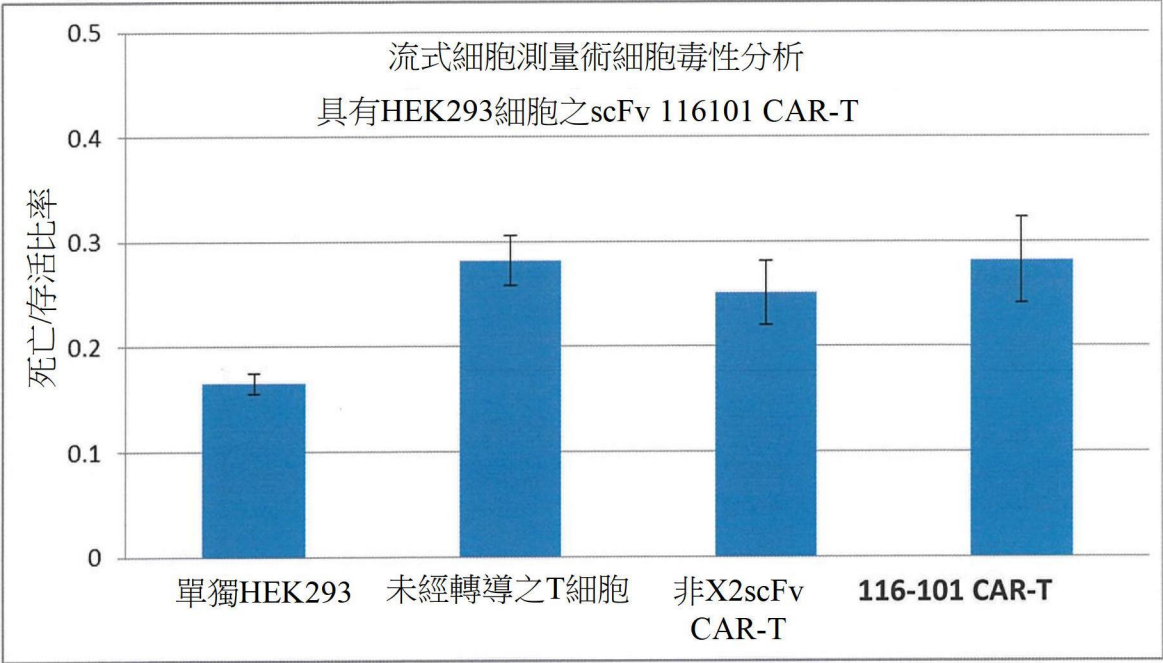
【圖9B】



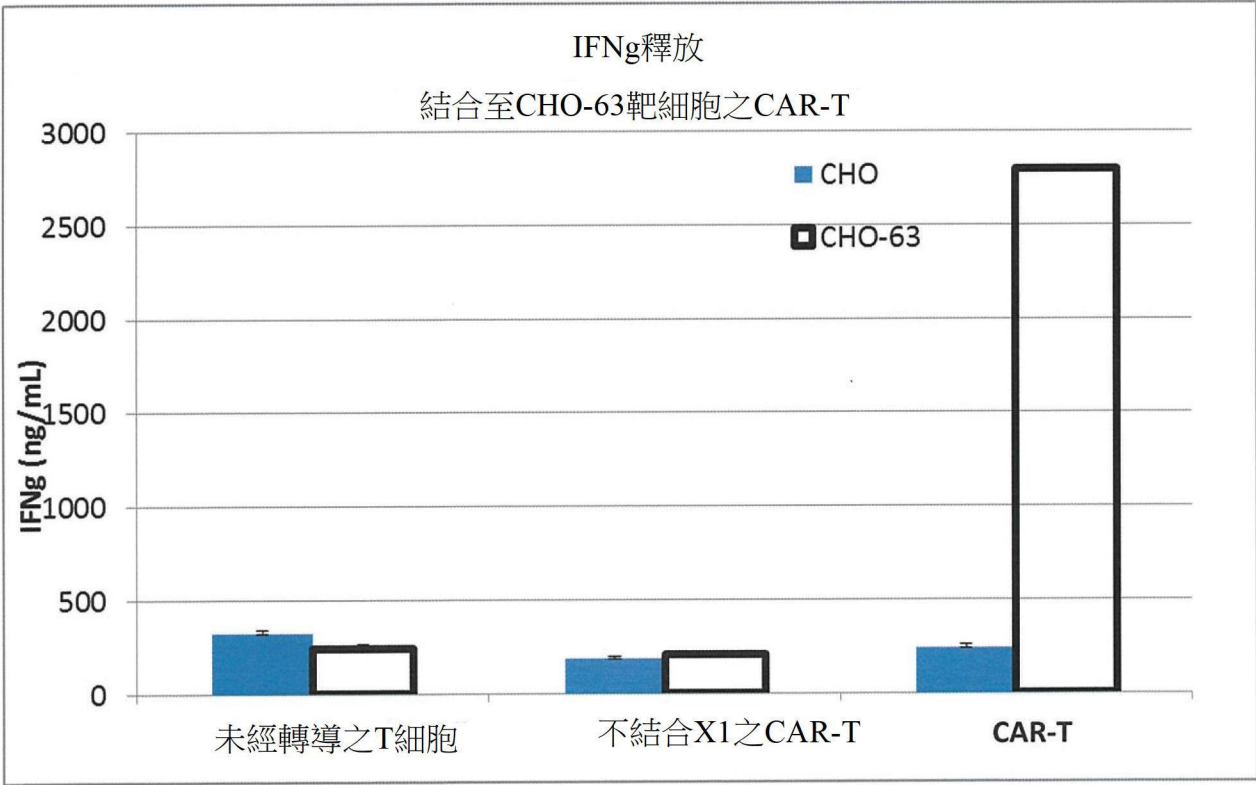
【圖10】



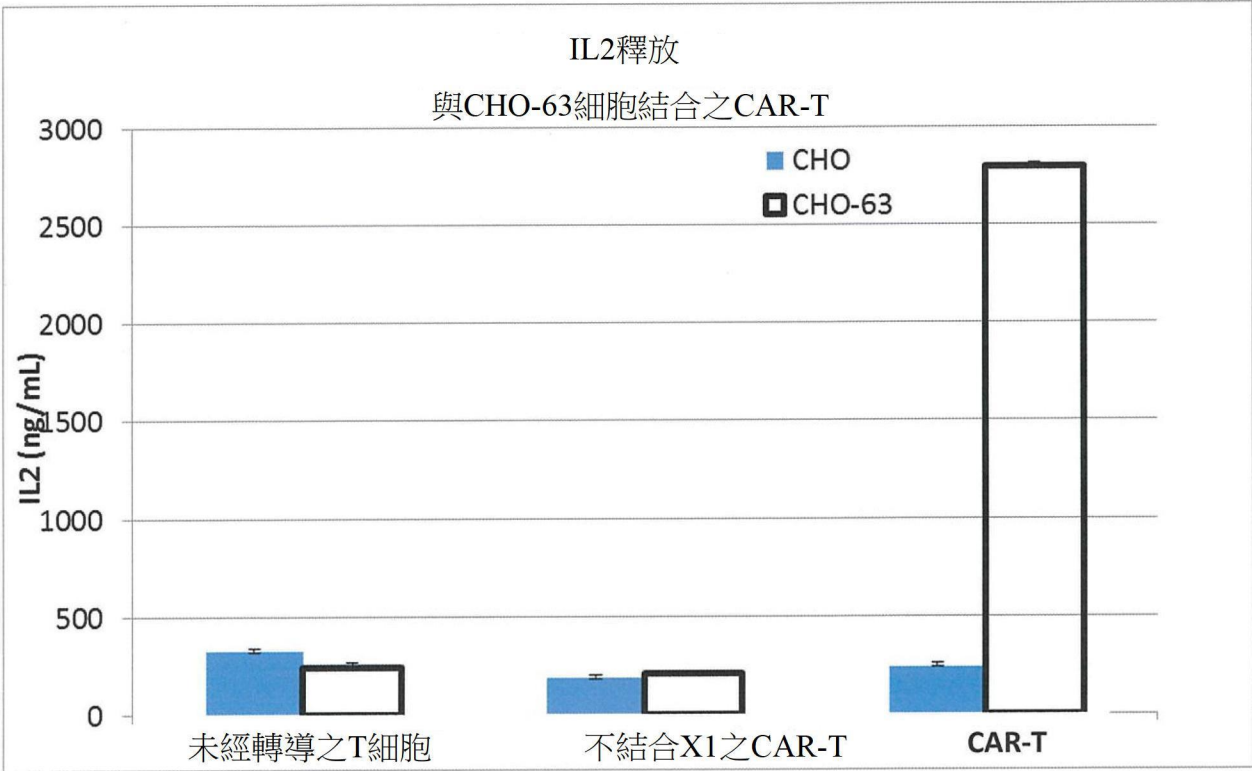
【圖11A】



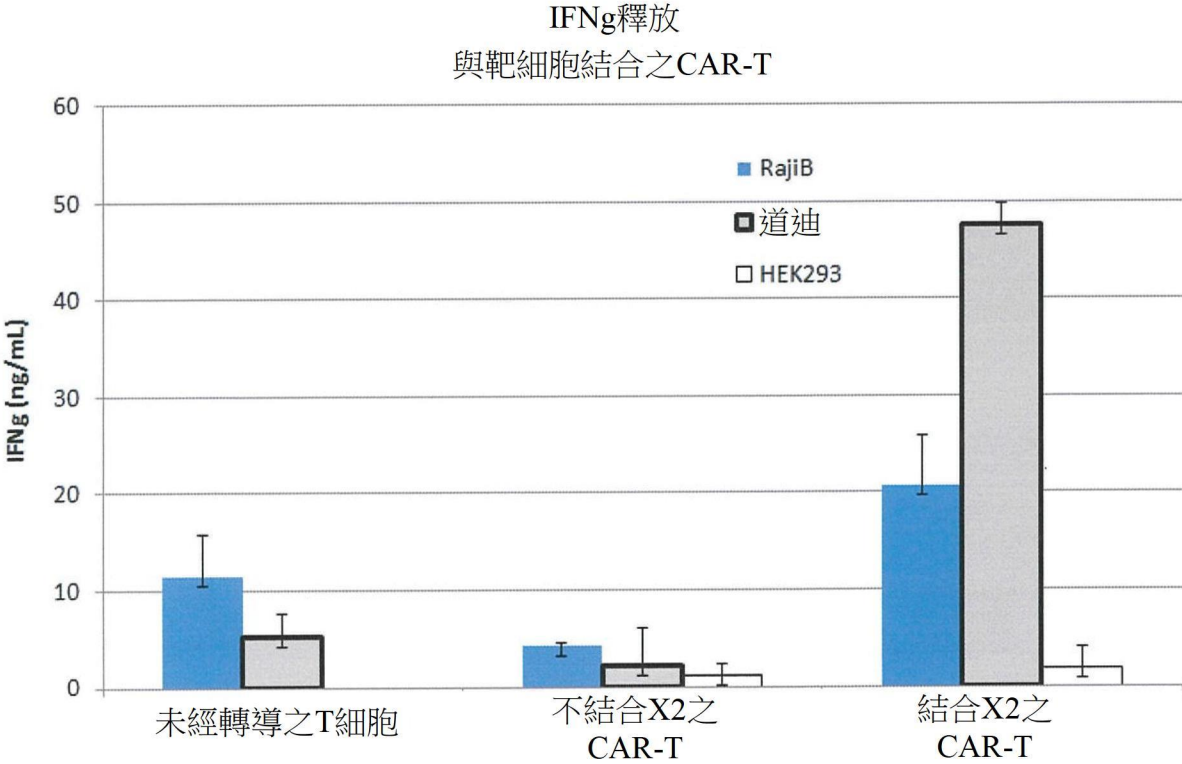
【圖11B】



【圖12A】



【圖12B】



【圖13A】

