



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117500838 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 02

(21) 申请号 202280027359.0

(22) 申请日 2022.02.10

(30) 优先权数据

63/148,489 2021.02.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/015981 2022.02.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/173950 EN 2022.08.18

(71) 申请人 宾夕法尼亚大学董事会

地址 美国宾夕法尼亚州

申请人 国立癌症中心

(72) 发明人 C·H·祝恩 K·渡边 R·M·杨

J·苏古勒 H·西川

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

专利代理师 姚远

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书87页

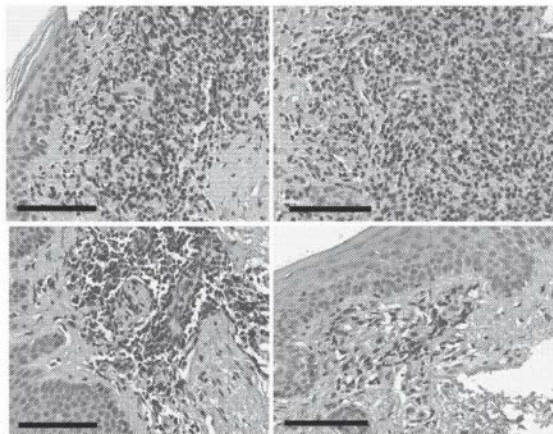
序列表109页 附图53页

(54) 发明名称

CCR4靶向嵌合抗原受体细胞疗法

(57) 摘要

本公开提供抗CCR4嵌合抗原受体 (CAR) 以及用于包括抗CCR4CAR的修饰的免疫细胞或其前体 (例如, 修饰的T细胞) 的组合物和方法。还提供使用表达抗CCR4CAR的细胞治疗癌症的方法和与抗CCR4CAR T细胞疗法组合使用的T细胞耗竭系统。



1. 抗CC趋化因子受体4 (CCR4) 嵌合抗原受体 (CAR), 其包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

2. 根据权利要求1所述的CAR, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区 (HCDR), 所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的CAR, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区 (LCDR), 所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的CAR, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段 (scFv) 或单结构域抗体。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的CAR, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段 (scFv)。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的CAR, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段 (scFv), 其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的CAR, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区, 所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的CAR, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区, 所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的CAR, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的CAR, 其中所述CAR还包括CD8 α 铰链, 任选地其中CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的CAR, 其中所述跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域: 人工疏水序列, 和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域, 或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的跨膜结构域。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的CAR, 其中所述跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域, 任选地其中所述CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的CAR, 其中所述胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的CAR, 其中所述胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域: TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3 (CD276), 或其变体, 或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞内结构域。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的CAR, 其中所述胞内结构域包括4-1BB的共刺激

结构域,其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

16.根据前述权利要求中任一项所述的CAR,其中所述胞内结构域包括选自以下的蛋白质的胞内信号传导结构域:人CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d,或其变体。

17.根据前述权利要求中任一项所述的CAR,其中所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体,其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

18.根据前述权利要求中任一项所述的CAR,其中所述CAR包括:包括抗CCR4 scFv的抗CCR4抗原结合结构域、CD8 α 铰链、CD8 α 跨膜结构域、包括4-1BB共刺激结构域的胞内结构域、和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

19.根据权利要求18所述的CAR,其中所述CAR还包括CD8前导序列,其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

20.根据前述权利要求中任一项所述的CAR,其中所述CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

21.根据前述权利要求中任一项所述的CAR,其中所述CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列编码。

22.根据前述权利要求中任一项所述的CAR,其中所述CAR通过可自切割连接体与安全开关连接,并且其中所述安全开关结合安全开关剂。

23.根据权利要求22所述的CAR,其中所述安全开关选自:

- (a) 截短的EGFR (EGFRt),其中所述安全开关剂是抗EGFR抗体,任选地是西妥昔单抗;
- (b) CD20,其中所述安全开关剂是抗CD20抗体,任选地是利妥昔单抗;
- (c) 诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9),其中所述安全开关剂是AP1903;和
- (d) 单纯疱疹病毒-1胸苷激酶 (HSVTK),其中所述安全开关剂是更昔洛韦 (GCV)。

24.根据权利要求22或23所述的CAR,其中所述CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGF β 受体 (dnTGF β RII) 连接。

25.根据权利要求22或权利要求23所述的CAR,其中所述安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGF β 受体 (dnTGF β RII) 连接。

26.包括编码抗CCR4 CAR的多核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

27.根据权利要求26所述的核酸,其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区 (HCDR),所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

28.根据权利要求25或27所述的核酸,其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区 (LCDR),所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

29.根据权利要求26-28中任一项所述的核酸,其中所述抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段 (scFv) 或单结构域抗体。

30. 根据权利要求26-29中任一项所述的核酸,其中所述抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv)。

31. 根据权利要求26-30中任一项所述的核酸,其中所述抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv),其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

32. 根据权利要求26-31中任一项所述的核酸,其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

33. 根据权利要求26-32中任一项所述的核酸,其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

34. 根据权利要求26-33中任一项所述的核酸,其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

35. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述CAR还包括CD8 α 铰链,任选地其中所述CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

36. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域:人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

37. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域,任选地其中所述CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

38. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

39. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域:TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3 (CD276),或其变体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的胞内结构域。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域,其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

41. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述胞内结构域包括选自以下的蛋白质的胞内信号传导结构域:人CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d,或其变体。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体,其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述CAR包括:包括抗CCR4 scFv的抗CCR4抗原结合结构域、CD8 α 铰链、CD8 α 跨膜结构域、包括4-1BB共刺激结构域的胞内结构域、和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

44. 根据权利要求43所述的核酸,其中所述CAR还包括CD8前导序列,其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列编码。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸,其中所述CAR通过可自切割连接体与安全开关连接,并且其中所述安全开关结合安全开关剂。

48. 根据权利要求47所述的核酸,其中所述安全开关选自:

- (a) 截短的EGFR (EGFRt), 其中所述安全开关剂是抗EGFR抗体, 任选地是西妥昔单抗;
- (b) CD20, 其中所述安全开关剂是抗CD20抗体, 任选地是利妥昔单抗;
- (c) 诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9), 其中所述安全开关剂是AP1903; 和
- (d) 单纯疱疹病毒-1胸苷激酶 (HSVTK), 其中所述安全开关剂是更昔洛韦 (GCV)。

49. 根据权利要求47或权利要求48所述的核酸,其中所述CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体 (dnTGFbRII) 连接。

50. 根据权利要求47或权利要求48所述的核酸,其中所述安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体 (dnTGFbRII) 连接。

51. 载体,其包括权利要求26-50中任一项所述的核酸。

52. 根据权利要求51所述的载体,其中所述载体是选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体的病毒载体。

53. 根据权利要求52所述的载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

54. 修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包括权利要求1-25中任一项所述的CAR、权利要求26-50中任一项所述的核酸和/或权利要求51-53中任一项所述的载体。

55. 根据权利要求54所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其还包括以下中的一项或多项;

- (a) CCR4无效敲除等位基因;
- (b) 被抑制的CCR4基因表达; 和
- (c) 包括抗CCR4 scFv和KDEL基序的融合蛋白和/或编码所述融合蛋白的核酸。

56. 根据权利要求55所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中所述CCR4无效敲除等位基因或被抑制的CCR4基因表达是通过包括选自以下的核酸酶的基因工程技术获得的: 成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 相关核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 和锌指核酸酶。

57. 根据权利要求55或56所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其还包括抑制CCR4基因表达的抑制性RNA分子。

58. 根据权利要求57所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中所述抑制性RNA分子选自: RNA干扰 (RNAi) RNA、短发夹RNA (shRNA)、小干扰RNA (siRNA)、反式作用siRNA (tasRNA)、微小RNA (miRNA)、反义RNA (asRNA)、长非编码RNA (lncRNA)、CRISPR RNA (crRNA)、反式激活

crRNA(tracrRNA)、指导RNA(gRNA)、单指导RNA(sgRNA)、双链RNA(dsRNA)、核酶及其任意组合。

59.根据权利要求54-58中任一项所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中所述修饰的细胞是自体细胞。

60.根据权利要求54-59中任一项所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中所述修饰的免疫细胞源自外周血单核细胞(PBMC)。

61.根据权利要求60所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中所述PBMC包括肿瘤细胞。

62.根据权利要求54-61中任一项所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中所述修饰的免疫细胞或其前体细胞是从人对象分离的细胞。

63.根据权利要求54-62中任一项所述的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中所述修饰的免疫细胞是修饰的T细胞。

64.用于产生修饰的免疫细胞或其前体细胞的方法,包括将权利要求26-50中任一项所述的核酸或权利要求51-53中任一项所述的载体导入所述免疫细胞或其前体细胞。

65.根据权利要求58所述的方法,其中所述载体是通过病毒转导导入的。

66.治疗对其有需要的对象中的癌症的方法,包括向所述对象施用权利要求54-63中任一项所述的修饰的免疫细胞或前体细胞,或通过权利要求64或权利要求65所述的方法产生的修饰的免疫细胞或其前体细胞。

67.根据权利要求66所述的方法,其中所述修饰的细胞耗竭所述对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞,从而治疗所述癌症。

68.根据权利要求66或67所述的方法,其中所述对象先前已经施用莫格利珠单抗。

69.根据权利要求66-68中任一项所述的方法,其中所述癌症是莫格利珠单抗难治的。

70.治疗对其有需要的对象中的癌症的方法,包括向所述对象施用包括抗CCR4 CAR的修饰的T细胞,其中所述CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

71.根据权利要求70所述的方法,其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区(HCDR),所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

72.根据权利要求70或权利要求71所述的方法,其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区(LCDR),所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

73.根据权利要求70-72中任一项所述的方法,其中所述抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

74.根据权利要求70-73中任一项所述的方法,其中所述抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv)。

75.根据权利要求70-74中任一项所述的方法,其中所述抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv),其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

76.根据权利要求70-75中任一项所述的方法,其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

77. 根据权利要求70-76中任一项所述的方法, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区, 所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

78. 根据权利要求70-77中任一项所述的方法, 其中所述抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

79. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述CAR还包括CD8 α 铰链, 任选地其中所述CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

80. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域: 人工疏水序列, 和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域, 或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的跨膜结构域。

81. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域, 任选地其中所述CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

82. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

83. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域: TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3 (CD276), 或其变体, 或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞内结构域。

84. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域, 其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

85. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述胞内结构域包括选自以下的蛋白质的胞内信号传导结构域: 人CD3 ζ 链 (CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d, 或其变体。

86. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体, 其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

87. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述CAR包括: 包括抗CCR4 scFv的抗CCR4抗原结合结构域、CD8 α 铰链、CD8 α 跨膜结构域、包括4-1BB共刺激结构域的胞内结构域、和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述CAR还包括CD8前导序列, 其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

89. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

90. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%

同一性的核苷酸序列编码。

91. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述CAR通过可自切割连接体与安全开关连接, 并且其中所述安全开关结合安全开关剂。

92. 根据权利要求91所述的方法, 其中所述安全开关选自:

- (a) 截短的EGFR (EGFRt), 其中所述安全开关剂是抗EGFR抗体, 任选地是西妥昔单抗;
- (b) CD20, 其中所述安全开关剂是抗CD20抗体, 任选地是利妥昔单抗;
- (c) 诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9), 其中所述安全开关剂是AP1903; 和
- (d) 单纯疱疹病毒-1胸苷激酶 (HSVTK), 其中所述安全开关剂是更昔洛韦 (GCV)。

93. 根据权利要求91或权利要求92所述的方法, 其中所述CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体 (dnTGFbRII) 连接。

94. 根据权利要求91或权利要求92所述的方法, 其中所述安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体 (dnTGFbRII) 连接。

95. 根据权利要求91-94中任一项所述的方法, 还包括向所述对象施用所述安全开关剂。

96. 根据权利要求70-95中任一项所述的方法, 其中所述修饰的T细胞耗竭所述对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞, 从而治疗所述癌症。

97. 根据权利要求70-96中任一项所述的方法, 其中所述修饰的T细胞源自PBMC。

98. 根据权利要求97所述的方法, 其中所述PBMC包括肿瘤细胞。

99. 根据权利要求70-98中任一项所述的方法, 其中所述修饰的T细胞是人T细胞。

100. 根据权利要求70-99中任一项所述的方法, 其中所述修饰的T细胞是自体的。

101. 根据权利要求70-100中任一项的方法, 其中所述对象是人。

102. 根据权利要求70-101中任一项所述的方法, 其中所述对象先前已经施用莫格利珠单抗。

103. 根据权利要求70-102中任一项所述的方法, 其中所述癌症是莫格利珠单抗难治的。

CCR4靶向嵌合抗原受体细胞疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e) 要求2021年2月11日提交的美国临时专利申请号63/148,489的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 通过嵌合抗原受体 (CAR) T细胞疗法靶向T细胞淋巴瘤时面临的一项挑战是,靶抗原常常在T细胞和肿瘤细胞之间共享,导致正常T细胞和CAR T细胞产物自相残杀 (fratricidal) 损失。CC趋化因子受体4 (CCR4) 是一种G蛋白偶联的七跨膜结构域趋化因子受体,结合趋化因子CCL17/TARC和CCL22/MDC1。CCR4在多种成熟T细胞恶性肿瘤中高度表达,如大部分的成人T细胞白血病/淋巴瘤 (ATLL)、皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL) 和30-40%的外周T细胞淋巴瘤 (PTCL) 病例,并且在正常T细胞上具有独特的表达谱 (profile)。具体地,CCR4主要由2型和17型辅助T细胞 (Th2和Th17)、效应型调节T细胞 (Treg) 亚群和皮肤淋巴细胞抗原 (CLA)+皮肤归巢T细胞表达,但很少由其它辅助T细胞亚群和CD8+T细胞表达。所有表达CCR4的T细胞恶性肿瘤都显示出不良预后,且治愈性治疗罕见。此外,CCR4在肿瘤上具有功能性,并且其表达与不良的疾病结局相关。因此,CCR4是治疗成熟T细胞恶性肿瘤的潜在靶点。

[0004] 在单克隆抗体 (mAb) 治疗的背景下,已经提出了CCR4靶向疗法的可行性。莫格利珠单抗 (Mogamulizumab) (KW-0761) 是一种去岩藻糖基化人源化抗CCR4 mAb,经设计以引发增强的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。莫格利珠单抗的CTCL或ATLL的I/II期试验显示出可接受的安全性 (safety profile) 和一定的功效,而III期试验显示,与CTCL的标准疗法之一即伏立诺他 (vorinostat) 相比,莫格利珠单抗显著延长了CTCL患者的无进展生存期。不良事件与伏立诺他相当,尽管报道了一例严重的皮肤超敏反应 (史蒂文斯-约翰逊综合征),但大多数都可控制。基于这些试验,莫格利珠单抗已获药品和医疗器械局 (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA) 批准用于在日本治疗难治性ATLL、CTCL和PTCL,并在最近获FDA批准用于在美国治疗难治性CTCL。然而,大多数接受莫格利珠单抗治疗的患者都经历复发,因此很少治愈。此外,先前的一份报告表明,可建立功能性CCR4重定向嵌合抗原受体 (functional CCR4-redirection chimeric antigen receptor, CCR4-CAR) T细胞 (Perera LP, et al. Am J Hematol. 2017; 92 (9): 892-901)。然而,自相残杀性事件的确切机制及其与T细胞扩大、转导、功能、靶感知、表型和抗肿瘤功效的相关性仍不清楚。因此,本领域需要新型的抗CCR4、基于CAR的T细胞恶性肿瘤疗法来克服这些障碍和挑战。本发明解决了这一需求。

发明内容

[0005] 在一些方面中,本发明提供抗CC趋化因子受体4 (CCR4) 嵌合抗原受体 (CAR),其包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

[0006] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区 (HCDR),所

述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区(LCDR),所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0008] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

[0009] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv)。

[0010] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv),其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

[0011] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方式中,CAR还包括CD8 α 铰链,任选地其中CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方式中,跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域:人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0016] 在一些实施方式中,跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域,任选地其中CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方式中,胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

[0018] 在一些实施方式中,胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域:TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3(CD276),或其变体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的胞内结构域。

[0019] 在一些实施方式中,胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域,其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方式中,胞内结构域包括选自以下的蛋白质的胞内信号传导结构域:人CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d,或其变体。

[0021] 在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体,其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中,CAR包括:抗CCR4抗原结合结构域,其包括抗CCR4 scFv;CD8 α 铰链;CD8 α 跨膜结构域;胞内结构域,其包括4-1BB共刺激结构域;和CD3 ζ 胞内信号传导结构

域。

[0023] 在一些实施方式中,CAR还包括CD8前导序列,其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方式中,CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方式中,CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列编码。

[0026] 在一些实施方式中,CAR通过可自切割(self-cleavable)连接体与安全开关(safety switch)连接,并且其中安全开关结合安全开关剂。

[0027] 在一些实施方式中,安全开关选自:(a)截短的EGFR (EGFRt),其中安全开关剂是抗EGFR抗体,任选地是西妥昔单抗(cetuximab);(b)CD20,其中安全开关剂是抗CD20抗体,任选地是利妥昔单抗(rituximab);(c)诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9),其中安全开关剂是AP1903;和(d)单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSVTK),其中安全开关剂是更昔洛韦(ganciclovir,GCV)。

[0028] 在一些实施方式中,CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体(dominant negative TGFb receptor type II,dnTGFbRII)连接。

[0029] 在一些实施方式中,安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体(dnTGFbRII)连接。

[0030] 在一些方面中,本发明提供包括编码抗CCR4 CAR的多核苷酸序列的核酸,其中CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

[0031] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区(HCDR),所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区(LCDR),所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

[0034] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv)。

[0035] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv),其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

[0036] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0038] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0039] 在一些实施方式中,CAR还包括CD8 α 铰链,任选地其中CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

[0040] 在一些实施方式中,跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域:人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的跨膜结构域。

[0041] 在一些实施方式中,跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域,任选地其中CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

[0042] 在一些实施方式中,胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

[0043] 在一些实施方式中,胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域:TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3 (CD276),或其变体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞内结构域。

[0044] 在一些实施方式中,胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域,其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

[0045] 在一些实施方式中,胞内结构域包括选自以下的蛋白质的胞内信号传导结构域:人CD3 ζ 链 (CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d,或其变体。

[0046] 在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体,其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

[0047] 在一些实施方式中,CAR包括:抗CCR4抗原结合结构域,其包括抗CCR4 scFv;CD8 α 铰链;CD8 α 跨膜结构域;胞内结构域,其包括4-1BB共刺激结构域;和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

[0048] 在一些实施方式中,CAR还包括CD8前导序列,其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

[0049] 在一些实施方式中,CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0050] 在一些实施方式中,CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列编码。

[0051] 在一些实施方式中,CAR通过可自切割连接体与安全开关连接,并且其中安全开关结合安全开关剂。

[0052] 在一些实施方式中,安全开关选自:(a) 截短的EGFR (EGFRt),其中安全开关剂是抗EGFR抗体,任选地是西妥昔单抗;(b) CD20,其中安全开关剂是抗CD20抗体,任选地是利妥昔单抗;(c) 诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9),其中安全开关剂是AP1903;和(d) 单纯疱疹病毒-1胸苷激酶 (HSVTK),其中安全开关剂是更昔洛韦 (GCV)。

[0053] 在一些实施方式中,CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGF β 受体 (dnTGF β RII) 连接。

[0054] 在一些实施方式中,安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGF β 受体 (dnTGF β RII) 连接。

[0055] 在一些方面中,本发明提供载体,其包括本文所述的核酸。

[0056] 在一些实施方式中,载体是选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体的病毒载体。

[0057] 在一些实施方式中,病毒载体是慢病毒载体。

[0058] 在一些方面中,本发明提供修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包括本文所述的CAR、本文所述的核酸和/或本文所述的载体。

[0059] 在一些实施方式中,修饰的免疫细胞或其前体细胞还包括以下中的一项或多项;

[0060] (a) CCR4无效敲除等位基因;

[0061] (b) 被抑制的CCR4基因表达;和

[0062] (c) 包括抗CCR4 scFv和KDEL基序的融合蛋白和/或编码所述融合蛋白的核酸。

[0063] 在一些实施方式中,CCR4无效敲除等位基因或被抑制的CCR4基因表达是通过包括选自以下的核酸酶的基因工程技术获得的:成簇的规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR)相关核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和锌指核酸酶。

[0064] 在一些实施方式中,修饰的免疫细胞或其前体细胞还包括抑制CCR4基因表达的抑制性RNA分子。

[0065] 在一些实施方式中,抑制性RNA分子选自:RNA干扰(RNAi)RNA、短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、反式作用siRNA(tasiRNA)、微小RNA(miRNA)、反义RNA(asRNA)、长非编码RNA(lncRNA)、CRISPR RNA(crRNA)、反式激活crRNA(tracrRNA)、指导RNA(gRNA)、单指导RNA(sgRNA)、双链RNA(dsRNA)、核酶及其任意组合。

[0066] 在一些实施方式中,修饰的细胞是自体细胞。

[0067] 在一些实施方式中,修饰的免疫细胞源自外周血单核细胞(PBMC)。

[0068] 在一些实施方式中,PBMC包括肿瘤细胞。

[0069] 在一些实施方式中,修饰的免疫细胞或其前体细胞是从人对象分离的细胞。

[0070] 在一些实施方式中,修饰的免疫细胞是修饰的T细胞。

[0071] 在一些方面中,本发明提供产生修饰的免疫细胞或其前体细胞的方法,包括将本文所述的核酸或本文所述的载体导入免疫细胞或其前体细胞。

[0072] 在一些实施方式中,载体是通过病毒转导导入的。

[0073] 在一些方面中,本发明提供治疗对其有需要的对象中的癌症的方法,包括向对象施用实施方式54-63中任一项的修饰的免疫细胞或前体细胞,或通过实施方式64或实施方式65的方法产生的修饰的免疫细胞或其前体细胞。

[0074] 在一些实施方式中,修饰的细胞耗竭对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞,从而治疗癌症。

[0075] 在一些实施方式中,对象先前已经施用莫格利珠单抗。

[0076] 在一些实施方式中,癌症是莫格利珠单抗难治的。

[0077] 在一些方面中,本发明提供治疗对其有需要的对象中的癌症的方法,包括向对象施用包括抗CCR4 CAR的修饰的T细胞,其中CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

[0078] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区(HCDR),所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0079] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区(LCDR),所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0080] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

[0081] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv)。

[0082] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv),其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

[0083] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0084] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0085] 在一些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0086] 在一些实施方式中,CAR还包括CD8 α 铰链,任选地其中CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

[0087] 在一些实施方式中,跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域:人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0088] 在一些实施方式中,跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域,任选地其中CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

[0089] 在一些实施方式中,胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

[0090] 在一些实施方式中,胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域:TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3(CD276),或其变体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的胞内结构域。

[0091] 在一些实施方式中,胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域,其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

[0092] 在一些实施方式中,胞内结构域包括选自以下的蛋白质的胞内信号传导结构域:人CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d,或其变体。

[0093] 在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体,其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施方式中,CAR包括:抗CCR4抗原结合结构域,其包括抗CCR4 scFv;CD8 α 铰链;CD8 α 跨膜结构域;胞内结构域,其包括4-1BB共刺激结构域;和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

[0095] 在一些实施方式中,CAR还包括CD8前导序列,其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

[0096] 在一些实施方式中,CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0097] 在一些实施方式中,CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列编码。

[0098] 在一些实施方式中,CAR通过可自切割连接体与安全开关连接,并且其中安全开关结合安全开关剂。

[0099] 在一些实施方式中,安全开关选自:(a)截短的EGFR (EGFRt),其中安全开关剂是抗EGFR抗体,任选地是西妥昔单抗;(b)CD20,其中安全开关剂是抗CD20抗体,任选地是利妥昔单抗;(c)诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9),其中安全开关剂是AP1903;和(d)单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSVTK),其中安全开关剂是更昔洛韦(GCV)。

[0100] 在一些实施方式中,CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体(dnTGFbRII)连接。

[0101] 在一些实施方式中,安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体(dnTGFbRII)连接。

[0102] 在一些实施方式中,方法还包括向对象施用安全开关剂。

[0103] 在一些实施方式中,修饰的T细胞耗竭(depletes)对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞,从而治疗癌症。

[0104] 在一些实施方式中,修饰的T细胞源自PBMC。

[0105] 在一些实施方式中,PBMC包括肿瘤细胞。

[0106] 在一些实施方式中,修饰的T细胞是人T细胞。

[0107] 在一些实施方式中,修饰的T细胞是自体的。

[0108] 在一些实施方式中,对象是人。

[0109] 在一些实施方式中,对象先前已经施用莫格利珠单抗。

[0110] 在一些实施方式中,癌症是莫格利珠单抗难治的。

附图说明

[0111] 通过下面结合附图对说明性实施方式的详细描述,将更全面地理解本发明的前述和其它特征及优点。

[0112] 图1示出了皮下T细胞淋巴瘤细胞表达高水平CCR4这一发现。使用免疫组织化学(IHC)评估了四名CTCL患者的皮肤活检样品上的CCR4表达。每个比例尺代表100um。

[0113] 图2示出了正常组织罕有表达CCR4这一发现。分析了正常组织微阵列(TMA)上27个器官(三次重复)的CCR4表达。下表表示TMA图。

[0114] 图3描绘了CCR4-CAR构建体的示意图。CD8前导,CD8前导序列;scFv,单链可变片段;TM,跨膜结构域。

[0115] 图4示出了CCR4-CAR T细胞可在耗竭表达CCR4的T细胞时进行扩大这一发现。用CCR4-CAR转导的T细胞扩大21天(左图)和第10天时的总加倍数(右图)。左图显示了代表性的T细胞扩大曲线。通过每隔一天加入新鲜培养基来计数T细胞并将其稀释至 0.7×10^6 个细

胞/ml。当T细胞大小降至 $350\mu\text{m}^3$ 时,收获T细胞以供后续实验,这时将一部分细胞备用以继续计数。右图显示了抗CD3/28刺激后第10天总的T细胞扩大的汇集(pooled)数据。点和棒表示平均值和平均值的标准误差(SEM) ($n=5$)。数据表示(左图)或汇集(右图)自来自5名供体的5项实验。通过单因素ANOVA,利用Tukey事后检验,ns,不显著;*, $p<0.05$;**, $p<0.01$;***, $p<0.001$;****, $p<0.0001$ (v.s.CD19CART组)。

[0116] 图5描绘了CAR T细胞产物的最终产率。用抗CD3/CD28珠刺激T细胞,然后用CCR4-CAR、对照CD19-CAR进行转导或未转导。当细胞大小降至 $350\mu\text{m}^3$ 时,收获T细胞并冷冻以供后续实验(一般在珠刺激后第10天和第14天之间)。显示了收获当天T细胞的总加倍数。棒表示平均值和SEM。数据汇集自来自5名供体的5项实验。通过单因素ANOVA,利用Tukey事后检验,ns,不显著;*, $p<0.05$;***, $p<0.001$ (v.s.19CART组)。

[0117] 图6描绘了CAR T细胞扩大期间的T细胞大小。每隔一天用细胞计数器(Coulter计数器)分析T细胞大小(右图)。右图显示了来自汇集数据的第10天的数据。数据表示或汇集自来自5名供体的5项实验。

[0118] 图7示出了CCR4-CAR T细胞可在耗竭表达CCR4的T细胞时扩大这一发现。T细胞存活率的时间进程分析。通过胺活性染料染色(LIVE-DEAD染色)和FCM分析细胞存活率。点和棒表示平均值和SEM($n=5$)。对第10天的数据进行统计分析。数据汇集自来自5名供体的5项实验。通过单因素ANOVA,利用Tukey事后检验,ns,不显著;*, $p<0.05$;**, $p<0.01$;***, $p<0.001$;****, $p<0.0001$ (v.s.CD19CART组)。

[0119] 图8描绘了根据第10天时CD45RO和CCR7表达的T细胞记忆表型。数字表示每个象限中细胞的百分比。

[0120] 图9示出了CCR4-CAR T细胞可在耗竭表达CCR4的T细胞时扩大这一发现。对T细胞的CAR表达的时间进程分析显示,在某些类型的CAR T细胞中的CAR阳性细胞选择。点和棒表示平均值和SEM($n=5$)。对第10天的数据进行统计分析。数据汇集自来自5名供体的5项实验。通过单因素ANOVA,利用Tukey事后检验,ns,不显著;*, $p<0.05$;**, $p<0.01$;***, $p<0.001$;****, $p<0.0001$ (v.s.CD19CART组)。

[0121] 图10描绘了CAR在T细胞表面的表达。在刺激后第10天,通过FCM分析CAR表达。门表示CAR阳性群体,而数字表示CAR阳性百分比。

[0122] 图11描绘了用于CCR4-CAR构建的抗CCR4 mAb不与检测抗体共享CCR4的表位。用纯化的CCR4 mAb克隆KW-0761或h1567阻断HH细胞上的CCR4,然后用克隆KW-0761(缀合了Ax647)、h1567(缀合了PE)或D8SEE(缀合了PE)染色。通过FCM分析CCR4。虽然即使在使用克隆KW-0761和h1567阻断CCR4之后,仍可检测到CCR4,但是KW-0761通过检测mAb(D8SEE)略微降低了检测效率。

[0123] 图12示出了CCR4-CAR T细胞可在耗竭表达CCR4的T细胞时扩大这一发现。代表性流程图显示刺激后第6天T细胞上CAR和CCR4的表达。数字表示每个象限中细胞的百分比。数据表示自来自5名供体的5项实验。通过单因素ANOVA,利用Tukey事后检验,ns,不显著;*, $p<0.05$;**, $p<0.01$;***, $p<0.001$;****, $p<0.0001$ (v.s.CD19CART组)。

[0124] 图13示出了CCR4-CAR T细胞可在耗竭表达CCR4的T细胞时扩大这一发现。CCR4表达的代表性动力学(左图)和第10天时CCR4表达的汇集数据(右图)。棒表示平均值和SEM($n=5$)。数据表示(左图)或汇集(右图)自来自5名供体的5项实验。通过单因素ANOVA,利用

Tukey事后检验, ns, 不显著; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ (v.s. CD19CAR组)。

[0125] 图14描绘了CAR T细胞扩大期间CD4/8比的变化。通过FCM分析了每个时间点CAR阳性群体(上图)和CAR阴性群体(下图)中的CD4/8比。数据汇集自来自5名供体的5项实验。通过单因素ANOVA, 利用Tukey事后检验, ns, 不显著; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (v.s. 第10天19CAR组)。

[0126] 图15描绘了用两种不同的CCR4-CAR转导的HH细胞; CCR4-CAR (KW_L2H) 和CCR4-CAR (h1567_L2H) (与图16有关)。通过FCM分析HH细胞上CCR4-CAR的表达。

[0127] 图16示出了CCR4-CAR T细胞可在耗竭表达CCR4的T细胞时扩大这一发现。CCR4-CAR对HH细胞的CCR4表位特异性阻断。显示了用指示的CCR4 CAR转导的HH细胞上用抗CCR4mAb克隆h1567(左图)或抗CCR4 mAb克隆KW-0761(右图)检测到的CCR4表达。数据表示2项实验。通过单因素ANOVA, 利用Tukey事后检验, ns, 不显著; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ (v.s. CD19CAR组)。

[0128] 图17示出了自相残杀改变Th亚群比例, 其中Th2、Th17和Treg细胞因子产生减少, 同时庇护(spared) Th1细胞因子产生这一发现。CAR T细胞产物的Th1亚群和Th2亚群之比。Th1亚群被定义为CD4(+)、CXCR3(+)、CCR4(-)、CCR6(-)和CCR10(-)。根据FCM, 将Th2亚群定义为CD4(+)、CXCR3(-)、CCR4(+)、CCR6(-)和CCR10(-)。按门控CAR阳性群体(UTD组除外)分析表型。数据汇集自来自3名供体的3项实验。棒表示平均值和SEM ($n = 3$)。通过单因素ANOVA, 利用Tukey事后检验, ns, 不显著; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ (v.s. CD19-CAR T组)。

[0129] 图18示出了自相残杀改变Th亚群比例, 其中Th2、Th17和Treg细胞因子产生减少, 同时庇护Th1细胞因子产生这一发现。CCR4-CAR T细胞相对于CD19-CAR T细胞产生Th相关细胞因子的热图。用PMA/Iono刺激CAR T细胞。通过LUMINEX测定分析刺激后24小时上清液的细胞因子水平。CD19-CAR T细胞的细胞因子水平设为1。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0130] 图19示出了自相残杀改变Th亚群比例, 其中Th2、Th17和Treg细胞因子产生减少, 同时庇护Th1细胞因子产生这一发现。通过向CD19-CAR T细胞中加入CCR4-CAR T细胞来耗竭CCR4阳性亚群。分别用CCR4 CAR或CD19 CAR刺激和转导T细胞。刺激后第5天, 向CD19-CAR T细胞中加入10%数量的CCR4-CAR T细胞。第10天分析CD19-CAR阳性细胞中的CCR4表达。数字表示每个象限中细胞的百分比。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0131] 图20示出了自相残杀改变Th亚群比例, 其中Th2、Th17和Treg细胞因子产生减少, 同时庇护Th1细胞因子产生这一发现。用CCR4-CAR T细胞预处理的CD19-CAR T细胞相对于未处理的CD19-CAR T细胞产生Th相关细胞因子的热图。用指示的刺激物刺激CAR T细胞。通过LUMINEX测定分析刺激后24小时上清液的细胞因子水平。未处理的CD19-CAR T细胞的细胞因子水平设为1。

[0132] 图21描绘了通过FCM的在肿瘤细胞系上CCR4的表达。每一栏中的数字表示CCR4-PE的MFI。NaIm6、HH、MJ和HuT78分别源自B-ALL、白血病CTCL、赛塞利综合征和HTLV-1阳性MF患者的细胞系。

[0133] 图22描绘了CAR T细胞对肿瘤细胞系的裂解活性。以指示的E:T比来温育CAR T细

胞和表达萤光素酶的肿瘤细胞。基于发光来测定共培养16小时时的特异性裂解。棒表示平均值和SD(三次重复)。数据表示来自3名供体的3项实验。

[0134] 图23描绘了CCR4-CAR T细胞的脱粒和细胞因子产生。在莫能菌素和CD107a检测抗体存在的情况下,以1:4的R:S比用培养基、PMA-Iono或指示的细胞刺激CAR T细胞。在共培养6小时后,使用FoxP3染色缓冲液组对细胞进行细胞内细胞因子染色,并通过FCM进行分析。棒表示平均值和SD(两次重复)。数据表示来自3名供体的3项实验。

[0135] 图24示出了CCR4-CAR (KW_L2H) 治愈HH细胞异种移植小鼠并引发优异的T细胞移入这一发现。实验示意图。NSG小鼠静脉接种表达萤光素酶的 1×10^6 个HH细胞(HH-CGB-GFP)。肿瘤细胞接种后7天,用 0.5×10^6 个CCR4-CAR阳性T细胞或未转导T细胞对移入的肿瘤进行静脉内处理。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0136] 图25示出了CCR4-CAR (KW_L2H) 治愈HH细胞异种移植小鼠并引发优异的T细胞移入这一发现。BLI肿瘤负荷整体动力学。虚线表示通过对无肿瘤小鼠成像测定的光子的背景水平。点和棒表示平均值和SEM(UTD组n=4,其它组n=5)。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0137] 图26示出了CCR4-CAR (KW_L2H) 治愈HH细胞异种移植小鼠并引发优异的T细胞移入这一发现。Kaplan-Meier法生存曲线。通过Log-rank检验,*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (v.s.KW_L2H组)。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0138] 图27示出了CCR4-CAR (KW_L2H) 治愈HH细胞异种移植小鼠并引发优异的T细胞移入这一发现。通过FCM在第12天和第19天对外周血的T细胞计数。通过单因素ANOVA,利用Tukey事后检验,*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ (v.s.KW_L2H组)。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0139] 图28描绘了CCR4-CAR T细胞处理期间的BW变化。点和棒表示平均值和SEM(UTD组n=4,其它组n=5)。一些小鼠在处理30天内出现快速BW增加,反映出肿瘤侵袭导致的肝脾大。KW_L2H组的缓慢BW增加与小鼠的正常生长有关,因为KW_L2H组的所有小鼠在处理期间都保持CR。

[0140] 图29描绘了用截短的CD19转导的HH细胞上的CD19表达。HH细胞用截短的CD19转导并重复分选以纯化CD19阳性群体。点图显示了FCM中100%纯度的CD19表达。门表示CD19阳性群体,而数字表示阳性细胞的百分比(左图)或PE的MFI(右图)。

[0141] 图30示出了在移入表达CD19的HH(HH-CBG-GFP-t19)的NSG小鼠中CCR4-CAR (KW_L2H) 引发与CD19-CAR相当的抗肿瘤功效这一发现。实验示意图。NSG小鼠静脉内接种表达萤光素酶和截短的CD19的 1×10^6 个HH细胞(HH-CGB-GFP-t19)。在肿瘤细胞接种后7天,用 2×10^6 个CCR4-CAR阳性T细胞或UTD T细胞静脉内处理移入的肿瘤。

[0142] 图31示出了在移入表达CD19的HH(HH-CBG-GFP-t19)的NSG小鼠中CCR4-CAR (KW_L2H) 引发与CD19-CAR相当的抗肿瘤功效这一发现。虚线表示通过对无肿瘤小鼠成像测定的光子的背景水平。点和棒表示平均值和SEM(UTD组n=5,其它组n=7)。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0143] 图32示出了在移入表达CD19的HH(HH-CBG-GFP-t19)的NSG小鼠中CCR4-CAR (KW_L2H) 引发与CD19-CAR相当的抗肿瘤功效这一发现。第7天和第14天的外周血T细胞计数。在第7天和第14天,使用计数珠通过FCM分析外周血的T细胞计数。棒表示平均值和SEM(UTD组n=5,其它组n=7)。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0144] 图33描绘了第7、14和28天外周血的T细胞计数(与图32有关)。通过FCM分析外周血的总T细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞计数。棒表示平均值和SEM。点和棒表示平均值和SEM。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0145] 图34示出了在移入表达CD19的HH(HH-CBG-GFP-t19)的NSG小鼠中CCR4-CAR(KW_L2H)引发与CD19-CAR相当的抗肿瘤功效这一发现。第6天血清的细胞因子水平。使用与图A、B和C相同的实验计划表,在第6天从小鼠全血中收集血清。通过高灵敏度LUMINEX测定分析细胞因子。棒表示平均值和SEM(UTD组n=4,其它组n=5)。通过单因素ANOVA,利用Tukey事后检验,ns,不显著;* $p<0.05$;** $p<0.01$;**** $p<0.0001$ 。

[0146] 图35描绘了原代CTCL细胞的表型。原代CTCL细胞获自赛塞利综合征患者。通过FCM分析肿瘤细胞的表型。正常T细胞群(CD8阳性或CD4、CD8和CD26阳性)非常罕见。

[0147] 图36示出了CCR4-CAR⁺T细胞可裂解患者来源的原代CTCL细胞并对其反应这一发现。CCR4-CAR⁺T细胞刺激原代CTCL细胞后产生细胞因子。通过细胞内染色和FCM分析刺激后6小时CAR⁺T细胞的细胞因子产生。门表示CAR阳性细胞中指示的细胞因子的阳性群体。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0148] 图37示出了CCR4-CAR⁺T细胞可裂解患者来源的原代CTCL细胞并对其反应这一发现。CCR4-CAR⁺T细胞对原代CTCL细胞的裂解活性。通过⁵¹Cr释放测定分析共培养4小时时CAR⁺T细胞对各细胞的杀伤活性。点和棒表示平均值和SD(三次重复)。数据表示来自2名供体的2项实验。

[0149] 图38示出了CCR4CAR_KW_L2H_tEGFR载体图。

[0150] 图39示出了CCR4CAR_KW_L2H_CD20载体图。

[0151] 图40示出了CCR4CAR_KW_L2H_iCasp9载体图。

[0152] 图41示出了CCR4CAR_KW_L2H_HSVTK载体图。

[0153] 图42是示出使用HSVTK耗竭系统在7天培养中GCV引发的CAR⁺T细胞耗竭的图。

[0154] 图43示出了dnTGFbR-T2A-CCR4CAR-P2A-HSVTK载体图。

[0155] 图44示出了CCR4CAR-P2A-dnTGFbR-T2A-HSVTK载体图。

[0156] 图45示出了CCR4CAR-P2A-HSVTK-T2A-dnTGFbR载体图。

[0157] 图46是示出CCR4CAR-HSVTK-dnTGFbRII的细胞毒性的图。

[0158] 图47提供示出在表达CCR4的T细胞系HH和ATN-1中靶向CCR4的shRNA(shCCR4)有效敲低CCR4这一发现的数据。使用慢病毒,用sh-CCR4或sh-Cre(阴性对照)转导HH细胞(左图)和ATN-1细胞(右图)。在sh-RNA后第2天通过FCM分析CCR4表达。

[0159] 图48A-48D示出了通过仔细选择sh-CCR4靶序列可有效地产生CCR4敲低CCR4CART细胞这一发现。图48A提供shCCR4和CCR4-CAR双重转导的计划表。图48B提供显示抗CD3/28刺激后第3天(sh-RNA导入后第2天)T细胞上CCR4表达降低的数据。图48C显示在CCR4敲低CCR4-CAR⁺T细胞制备期间CART细胞扩大。提供最低敲低效率的Sh-CCR4#3引发更大的T细胞扩大。图48D显示T细胞刺激后第5天和第10天的CCR4-CAR表达。具有最低CCR4敲低效率的Sh-CCR4#3引发更大的T细胞扩大和CAR转导效率。

[0160] 图49A-49B示出了CCR4-CART细胞可治愈抗莫格利珠单抗抗肿瘤这一发现。图49A是抗莫格利珠单抗HH肿瘤异种移植小鼠模型的示意图。图49B提供示出CCR4-CAR⁺T细胞可治愈莫格利珠单抗难治性HH肿瘤这一发现的数据。

[0161] 图50A-50B示出了可从患者来源的PBMC有效且安全地建立CCR4-CAR T细胞这一发现。图50A显示T细胞刺激后第7、14和24天T细胞上的CCR4-CAR和CD19-CAR表达。图50B显示CCR4-CAR T细胞产物中,而非CD19-CAR T细胞产物中受污染的ATLL细胞显著减少。

具体实施方式

[0162] 本发明基于这一发现,即包括源自莫格利珠单抗的抗CCR4 CAR的CCR4-CAR T细胞对于杀伤肿瘤细胞,包括莫格利珠单抗难治性肿瘤细胞是高度有效的。功效显示在庇护Th1亚群(CCR4阴性)时,自相残杀耗竭Th2、Treg和Th17亚群(均为CCR4阳性)相关。

[0163] 本发明提供用于修饰的免疫细胞或其前体(例如,修饰的T细胞)的组合物和方法,所述修饰的免疫细胞或其前体包括能够结合CCR4的嵌合抗原受体(CAR)(抗CCR4 CAR)。还提供使用表达抗CCR4 CAR的细胞治疗癌症的方法,以及与抗CCR4 CAR细胞疗法组合使用的T细胞耗竭系统。一方面,本发明提供治疗癌症的方法,所述方法包括向患有癌症的对象施用包括抗CCR4 CAR的修饰细胞,其中修饰细胞耗竭对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞,从而治疗癌症。

[0164] 对CAR构建体,具体是scFv的优化可增强CAR效力。因此,在一个实施方式中,本公开鉴定了用于治疗T细胞恶性肿瘤的高效CCR4-CAR T细胞,并确定了潜在的CCR4-CAR介导的正常T细胞和CAR T细胞产物的自相残杀的影响。在其它实施方式中,本公开提供T细胞耗竭系统,其用作安全开关,与抗CCR4 CAR细胞疗法组合以在观察到瘤外(off-tumor)毒性时关闭CAR T细胞。

[0165] 应当理解,本公开中描述的方法不限于本文公开的具体方法和实验条件,因为这些方法和条件可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅仅是为了描述具体的实施方式,而不是为了进行限制。

[0166] 此外,除非另有指示,否则本文描述的实验使用本领域技术范围内常规的分子和细胞生物学和免疫学技术。这样的技术对于熟练的技术人员来说是公知的,并且在文献中充分地说明。参见,例如,Ausubel,et al.,ed.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,NY,N.Y.(1987-2008),包括所有增刊;MR Green和J.Sambrook的Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第四版);以及Harlow et al.,Antibodies:A Laboratory Manual,Chapter 14,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor(2013年,第2版)。

[0167] A. 定义

[0168] 除非另有定义,否则本文使用的技术和科学术语都具有与本领域普通技术人员的通常理解相同的含义。在有任何潜在模棱两可的情况下,本文提供的定义优先于任何字典或外在的定义。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。除非另有说明,否则“或”的使用是指“和/或”。术语“包括(including)”以及诸如“包括(includes)”和“包括的(included)”之类的其它形式的使用不是限制性的。

[0169] 总体上,关于本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质与核酸化学以及杂交所使用的命名法在本领域中是公知且常用的。除非另有说明,否则本文提供的方法和技术总体上是根据本领域公知并且如在整个本说明书中引用和讨论的各种一般的和更具体的参考文献中所述的常规方法进行的。酶促反应和纯化技术是

根据制造商的说明书进行的,如本领域通常完成的或如本文所述的那样。关于本文描述的分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学所使用的命名法,以及本文描述的分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学的实验室程序和技术是本领域公知和常用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0170] 为了更容易理解本公开,选择的术语定义如下。

[0171] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指代一个或多个(即,指代至少一个)该冠词的语法对象。举例来说,“一个元素”意为一个元素或多个元素。

[0172] 如本文使用的“约”,当指的是可测量的值如量、时间持续期等时,意指涵盖从指定值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 的变化,更优选 $\pm 5\%$,甚至更优选 $\pm 1\%$,以及还更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化,只要这种变化适于执行所公开的方法即可。

[0173] 如本文所用,“激活(活化,Activation)”指的是已经被充分地刺激以引发可检测的细胞增殖的T细胞的状态。激活也可与引发的细胞因子产生和可检测的效应物功能相关联。术语“激活的T细胞”指的是正经历细胞分裂的T细胞等。

[0174] 如本文所用,“减轻”疾病是指降低疾病的一种或多种症状的严重性。

[0175] 如本文所用的术语“抗原”被定义为激发免疫反应的分子。此免疫反应可涉及抗体产生,或特异性免疫活性细胞的激活,或两者。技术人员将理解任何大分子,实际上包括所有的蛋白质或肽,都可充当抗原。

[0176] 此外,抗原可源自重组DNA或基因组DNA。技术人员将理解任何DNA——其包含编码引起免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列,因此编码如本文使用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解抗原不必仅由基因的全长核苷酸序列编码。容易显而易见的是本发明包括但不限于多于一个的基因的部分核苷酸序列的用途,并且这些核苷酸序列以不同的组合进行布置以引起所需的免疫反应。此外,技术人员将理解抗原根本不必由“基因”编码。容易显而易见的是,抗原可被生成、合成或可源自生物学样品。这种生物学样品可包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物学流体。

[0177] 如本文所用,术语“自体的”意指关于源自相同个体的任何物质,其随后被再次导入该个体中。

[0178] “共刺激分子”是指与共刺激配体特异性结合,从而介导通过T细胞的共刺激反应——诸如但不限于增殖——的T细胞上的关联(cognate)结合伴侣(伙伴,partner)。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和Toll配体受体。

[0179] 如本文所用,“共刺激信号”是指结合初级信号诸如TCR/CD3连接,导致T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。

[0180] “疾病”是动物的一种健康状态,其中动物不能保持稳态,并且其中如果不改善该疾病,则动物的健康继续恶化。与之相比,动物的“障碍是一种健康状态,其中动物能够保持稳态,但其中动物的健康状态与它没有处于该障碍相比不太有利。不加以治疗,障碍不必定引起动物健康状态的进一步降低。

[0181] 如本文所用的术语“下调”是指一个或多个基因的基因表达的减少或消除。

[0182] “有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用,并且是指如本文所述有效实现特定生物学结果或提供治疗或预防益处的化合物、制剂、材料或组合物的量。这样的结果可包括但不限于当施用于哺乳动物时与在不存在本发明组合物的情况下检测到的免疫反应相

比,引起可检测水平的免疫抑制或耐受的量。免疫反应可容易地通过大量本领域公认的方法进行评估。本领域技术人员会理解本文所施用的组合物的量是变化的,并且可基于多种因素容易地确定,诸如所治疗的疾病或状况、所治疗的哺乳动物的年龄和健康状况以及身体状况、疾病的严重程度、所施用的特定化合物等。

[0183] “编码”是指多核苷酸诸如基因、cDNA或mRNA中核苷酸的特异性序列充当模板合成在生物学过程中的其它多聚体和大分子的固有性质,所述多聚体和大分子具有核苷酸(即,rRNA、tRNA和mRNA)的限定序列或氨基酸的限定序列中的任一个和由其产生的生物学性质。因此,如果相应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物学系统中产生蛋白质,则该基因编码蛋白质。核苷酸序列等同mRNA序列并通常提供在序列表中的编码链,和用作转录基因或cDNA的模板的非编码链两者,都可被称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0184] 如本文所用,“内源的”是指来自有机体、细胞、组织或系统的或在有机体、细胞、组织或系统内产生的任何物质。

[0185] 如本文所用的术语“表位”被定义为抗原上的可引发免疫反应(包括B和/或T细胞反应)的小化学分子。抗原可具有一个或多个表位。大多数抗原具有多个表位;即,它们是多价的。总体上,一个表位的大小约10个氨基酸和/或糖。优选地,表位约4-18个氨基酸,更优选约5-16个氨基酸,甚至更最优选6-14个氨基酸,更优选约7-12个氨基酸,以及最优选约8-10个氨基酸。本领域技术人员理解,通常而言分子的整体三维结构而非分子的特异性线性序列是抗原特异性的主要标准,因此来区分一个表位与另一个表位。基于本公开,本发明中使用的肽可以是表位。

[0186] 如本文所用,术语“外源的”是指从有机体、细胞、组织或系统导入的或在有机体、细胞、组织或系统外产生的任何物质。

[0187] 如本文所用,术语“扩大”是指数量增加,如T细胞数量增加。在一个实施方式中,离体扩大的T细胞的数量相对于原来存在于培养物中的数量增加。在另一实施方式中,离体扩大的T细胞的数量相对于培养物中的其它细胞类型增加。如本文所用,术语“离体”是指已经从活生物体(例如,人)移出并在该生物体外(例如,在培养皿、试管或生物反应器中)繁殖的细胞。

[0188] 如本文所用的术语“表达”被定义为特定核苷酸序列通过其启动子驱动的转录和/或翻译。

[0189] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含充足的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可由宿主细胞提供或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有那些表达载体,如并入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如,仙台病毒、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0190] 如本文使用的“同一性”是指两个多聚体分子之间,特别是两个氨基酸分子之间,诸如,两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个氨基酸序列在相同的位置处具有相同的残基时;例如,如果两个多肽分子中每一个中的某个位置均被精氨酸占据,则它们在该位置处是同一的。在比对时,两个氨基酸序列在相同位置处具有相同残基的同一性或程度经常表示为百分数。两个氨基酸序列之间的同一性是匹配或同一位置数目的直接函数;例如,如果两个序列中的一半位置(例如,十个氨基酸长度的多聚体中的五个位置)是同一的,则

这两个序列是50%同一的;如果90%的位置(例如,10个中的9个)是匹配的或同一的,则这两个氨基酸序列是90%同一的。

[0191] 如本文使用的术语“免疫反应”被定义为当淋巴细胞将抗原分子识别为异物和诱发形成抗体和/或激活淋巴细胞以去除抗原时发生的针对抗原的细胞反应。

[0192] 术语“免疫抑制”在本文中用于指减少整体免疫反应。

[0193] “分离的”意指从自然状态改变或移出。例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”,但是部分或完全与它的自然状态的共存物质分开的相同的核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或可以存在于非自然环境,诸如,例如,宿主细胞。

[0194] 如本文使用的“慢病毒”是指逆转录病毒科(Retroviridae)的一个属。在逆转录病毒中,慢病毒是唯一能够感染非分裂细胞的;它们可递送显著量的遗传信息进入宿主细胞的DNA中,因此它们是基因递送载体的最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV是慢病毒的所有实例。源自慢病毒的载体提供了实现显著水平的基因体内转移的手段。

[0195] 如本文使用的术语“修饰的”意指本发明的分子或细胞的改变的状态或结构。分子可以以多种方式被修饰,包括化学地、结构地和功能地。细胞可以通过导入核酸被修饰。

[0196] 如本文使用的术语“调节”意指与不存在治疗或化合物的对象中的反应水平相比,和/或与在其它方面相同但未经治疗的对象中的反应水平相比,介导对象中的反应水平的可检测的增加或减少。该术语涵盖扰乱和/或影响天然信号或反应,从而介导对象(优选地,人)中的有益的治疗性反应。

[0197] 在本发明的背景下,使用常见核酸碱基的下列缩写。“A”是指腺苷,“C”是指胞嘧啶,“G”是指鸟苷,“T”是指胸苷,以及“U”是指尿苷。

[0198] 术语“寡核苷酸”通常是指短的多核苷酸。应当理解,当核苷酸序列由DNA序列(即A、T、C、G)表示时,这也包括RNA序列(即A、U、C、G),其中“U”取代了“T”。

[0199] 除非另外指定,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此是简并形式并且编码相同的氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可包括内含子,就编码该蛋白质的核苷酸序列可以在一些译本中包含内含子(一个或多个)而言。

[0200] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。

[0201] 如本文使用的术语“多核苷酸”被定义为核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的多聚体。因而,如本文使用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有核酸是可以被水解为单体“核苷酸”的多核苷酸的一般知识。单体核苷酸可被水解为核苷。如本文使用的多核苷酸包括但不限于通过本领域可获得的任何手段——非限制性地包括重组手段,即,使用普通克隆技术和PCR等从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列,和通过合成手段——获得的所有核酸序列。

[0202] 如本文使用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用,并且是指由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对可以包含蛋白质的或肽的序列的氨基酸的最大数目没有限制。多肽包括任何肽或蛋白质,该肽或蛋白质包含通过肽键相互连接的两个或更多个氨基酸。如本文所用,该术语是指短链(在本领域中也通常被称为例如肽、寡肽和寡聚物);和较长链(在本领域中通常被称为蛋白质,其具

有多种类型)两者。“多肽”包括例如生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0203] 如本文关于抗体使用的术语“特异性结合”意指识别特异性抗原但是基本上不识别或不结合样品中的其它分子的抗体。例如,特异性结合来自一个物种的抗原的抗体也结合来自一个或多个物种的该抗原。但是,这样的跨物种反应性本身不将抗体的类别改变为是特异性的。在另一个实例中,特异性结合抗原的抗体也可以结合该抗原的不同等位基因形式。然而,这样的交叉反应性本身不将抗体的类别改变为是特异性的。在某些情况下,术语“特异性的结合”或“特异性结合”可以关于抗体、蛋白质或肽与第二化学物质的相互作用使用,意指相互作用依赖该化学物质上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别和结合特异性蛋白质结构,而不是一般地识别和结合蛋白质。如果抗体特异于表位“A”,则在包含标示的“A”和该抗体的反应中存在包含表位A(或游离的、未标示的A)的分子将降低结合该抗体的标示的A的量。

[0204] 术语“刺激”意指通过结合刺激分子(例如,TCR/CD3复合体)与其关联配体,从而介导信号转导事件——诸如,但不限于经由TCR/CD3复合体的信号转导——诱导的初次反应。刺激可介导某些分子的改变的表达,如TGF- β 的下调或细胞骨架结构的再组织等。

[0205] “刺激分子”,作为本文使用的术语,意指与存在于抗原呈递细胞上的关联刺激配体特异性结合的T细胞上的分子。

[0206] 如本文使用的“刺激配体”意指这样的配体:其当存在于抗原呈递细胞(例如,aAPC、树突细胞、B细胞等)时,可与T细胞上的关联结合伴侣(在本文称为“刺激分子”)特异性结合,从而介导T细胞的初次反应,其包括但不限于激活、起始免疫反应、增殖等。刺激配体在本领域是熟知的,并且涵盖,特别是使用肽、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体和超激动剂抗CD2抗体负载的MHC I类分子。

[0207] 术语“对象”意图包括其中可以引发免疫反应的活的生物体(例如,哺乳动物)。如本文使用的“对象”或“患者”可以是人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括,例如,家畜和宠物,如羊、牛、猪、狗、猫和鼠哺乳动物,以及猿和非人灵长类哺乳动物。优选地,对象是人。

[0208] “靶位点”或“靶序列”是指这样的核酸序列:其定义在足以发生结合的条件下结合分子可特异性结合的核酸的部分。在一些实施方式中,靶序列是指基因组核酸序列,其定义在足以发生结合的条件下结合分子可特异性结合的核酸的部分。

[0209] 如本文所用,术语“T细胞受体”或“TCR”是指响应抗原呈递而参与T细胞激活的膜蛋白的复合体。TCR负责识别与主要组织相容性复合体分子结合的抗原。TCR由 α 和 β 链的异二聚体组成,但在某些细胞中,TCR由 γ 和 δ (γ/δ)链组成。TCR可以以 α/β 和 γ/δ 形式存在,它们在结构上相似,但在解剖位置和功能上不同。每条链由两个胞外结构域组成,一个可变结构域和一个恒定结构域。在一些实施方式中,可在包含TCR的任意细胞上修饰TCR,这些细胞包括例如辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、记忆性T细胞、调节T细胞、自然杀伤T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

[0210] 如本文使用的术语“治疗性”意指治疗或预防。治疗性效果通过疾病状态的抑制、缓解或根除获得。

[0211] 如本文使用的术语“转染的”、“转化的”或“转导的”是指如下过程:通过该过程外

源性核酸被转移或导入宿主细胞。“转染的”、“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代对象细胞和其子代。

[0212] “治疗”疾病,作为本文使用的术语,意指降低对象经历的疾病或障碍的至少一种迹象或症状的频率或严重性。

[0213] “载体”是物质的组合物,其包含分离的核酸,并且其可以被用于将分离的核酸递送至细胞内部。众多载体在本领域是已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子化合物或两亲性化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也应当解释为包括促进将核酸转移入细胞的非质粒化合物和非病毒化合物,诸如,例如,聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0214] 范围:贯穿本公开内容,本发明的各个方面都可以以范围格式呈现。应当理解,以范围格式的描述仅仅出于方便和简洁,并且不应当解释为对本发明的范围的死板限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,诸如1至6的范围的描述应当被认为已经具体地公开了子范围诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数字,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。不管范围的宽度如何,这均适用。

[0215] B. 嵌合抗原受体

[0216] 本发明提供包括能够结合CCR4的嵌合抗原受体(CAR)的组合物和方法。本发明的CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。在某些实施方式中,抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4 scFv。在一些实施方式中,CAR包括抗CCR4 scFv、跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方式中,CAR还包括前导序列和铰链结构域。在优选的实施方式中,抗CCR4 scFv具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

[0217] 还提供用于修饰的免疫细胞或其前体(例如,修饰的T细胞)的组合物和方法,所述修饰的免疫细胞或其前体包括CAR。因此,在一些实施方式中,免疫细胞已被遗传修饰以表达CAR。还提供编码CAR的核酸、包括核酸的载体和包括CAR、载体或核酸的修饰细胞(例如,修饰的T细胞)。在某些实施方式中,核酸编码包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域的CAR并进一步编码安全开关,以在施用安全开关剂后在对象中引发CAR T细胞耗竭。CAR可通过本文所述的2A自切割序列如P2A或T2A序列与安全开关连接。在一个实施方式中,安全开关是截短的EGFR(EGFRt),而安全开关剂是抗EGFR抗体如西妥昔单抗。在一个实施方式中,安全开关是CD20,而安全开关剂是抗CD20抗体,如利妥昔单抗。在一个实施方式中,安全开关是诱导型胱天蛋白酶9(iCasp9),而安全开关剂是二聚化药物如AP1903。在一个实施方式中,安全开关是单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSVTK),而安全开关剂是更昔洛韦(GCV)。

[0218] 在某些实施方式中,CAR连接安全开关还包括显性负性II型TGF β 受体(dnTGF β RII)。在一些实施方式中,例如通过本文所述的2A自切割序列如P2A或T2A序列将CAR连接安全开关的CAR与dnTGF β RII连接。在一些实施方式中,CAR连接安全开关的安全开关例如经由本文所述的2A自切割序列如P2A或T2A序列与dnTGF β RII连接。在一些实施方式中,CAR连接安全开关的CAR和安全开关各自例如经由本文所述的2A自切割序列如P2A或T2A序列与dnTGF β RII连接。在一些实施方式中,CAR连接安全开关包括抗CCR4 CAR、HSVTK安全

开关和dnTGFbRII,其中抗CCR4 CAR、HSVTK和dnTGFbRII可以以从CAR连接安全开关的N-末端到C-末端的任何顺序存在。

[0219] CAR的抗原结合结构域可操作地连接到CAR的其它结构域如铰链、跨膜结构域或胞内结构域(其各自在本文别处都有描述)以供在细胞中表达。在一个实施方式中,编码抗原结合结构域的第一核酸序列可操作地连接到编码铰链和/或跨膜结构域的第二核酸,并且进一步可操作地连接到编码胞内结构域第三核酸序列。

[0220] 本文所述的抗原结合结构域可与本文所述的任意跨膜结构域、本文所述的任意胞内结构域或胞质结构域或者本文所述的可包括在本发明CAR中的任意其它结构域组合。本发明的CAR还可包括如本文所述的前导序列。本发明的CAR还可包括如本文所述的铰链结构域。本发明的CAR还可包括一个或多个如本文所述的间隔区结构域或连接体,它们可用于将CAR的一个结构域与相邻结构域连接。

[0221] 抗原结合结构域

[0222] CAR的抗原结合结构域是用于结合包括蛋白质、碳水化合物和糖脂的特异性靶抗原的CAR的胞外区。本发明的CAR包括能够结合CCR4的抗原结合结构域。

[0223] 抗原结合结构域可包括与抗原结合的任何结构域,并且可包括但不限于单克隆抗体(mAb)、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体、非人抗体、单结构域抗体、全长抗体或其任何抗原结合片段、Fab和单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,抗原结合结构域包括非糖基化(aglycosylated)抗体或其片段或其scFv。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括非岩藻糖基化(afucosylated)人源化抗CCR4 mAb。在某些实施方式中,抗原结合结构域是具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链的scFv。

[0224] 如本文所用,术语“单链可变区片段”或“scFv”是免疫球蛋白(例如,小鼠或人)的经共价连接以形成VH:VL异二聚体的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白。可变重链(VH)和轻链(VL)直接连接或通过肽连接体连接,该连接体将VH的N-末端与VL的C-末端连接,或将VH的C-末端与VL的N-末端连接。在一些实施方式中,抗原结合结构域(例如,CCR4结合结构域)包含具有N-末端至C-末端的构型(VH-连接体-VL)的scFv。在一些实施方式中,抗原结合结构域包含具有N-末端至C-末端的构型(VL-连接体-VH)的scFv。本领域技术人员将能够选择出用于本发明的适合的构型。

[0225] 连接体通常富含甘氨酸以实现柔韧性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以实现溶解性。连接体可连接胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区。连接体的非限制性实例在Shen et al.,Anal.Chem.80(6):1910-1917(2008)和WO 2014/087010(其内容特此通过引用以其整体并入)中公开。各种连接体序列是本领域已知的,非限制性地包括甘氨酸丝氨酸(GS)连接体,如(GS)_n、(SG)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:115)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:116)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:117),其中n代表至少是1的整数。示例性连接体序列可包含氨基酸序列,非限制性地包括GGSG(SEQ ID NO:118)、GGSGG(SEQ ID NO:119)、GSGSG(SEQ ID NO:120)、GSGGG(SEQ ID NO:121)、GGGSG(SEQ ID NO:122)、GSSSG(SEQ ID NO:123)、GGGGS(SEQ ID NO:124)、GGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:125)等。本领域技术人员将能够选择出用于本发明的适合的连接体序列。在一个实施方式中,本发明的抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH和VL由具有氨基酸序列GGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:125)的连接体序列分隔,该氨基酸序列可由核酸序列GGAGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTG

GAAGCGGGGAGGAGGTTCCGGCGGCGGAG GATCA(SEQ ID NO:126) 编码。

[0226] 尽管去除了恒定区并导入了连接体,但是scFv蛋白仍保持原始免疫球蛋白的特异性。如Huston,et al. (Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)描述的,单链Fv多肽抗体可由包含编码VH和VL的序列的核酸表达。另外参见美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;以及美国专利公开号20050196754和20050196754。已经描述了具有抑制活性的拮抗性scFv(参见,例如,Zhao et al.,Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51;Peter et al.,J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012August 12;Shieh et al.,J Immunol 2009 183(4):2277-85;Giomarelli et al.,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife et al.,J Clin Invest 2006116(8):2252-61;Brooks et al.,Immunotechnology 1997 3(3):173-84;Moosmayer et al.,Ther Immunol 1995 2(10:31-40))。已经描述了具有刺激活性的激动性scFv(参见,例如,Peter et al.,J Biochem 2003 25278(38):36740-7;Xie et al.,Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledbetter et al.,Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55;Ho et al.,Biochim Biophys Acta 20031638(3):257-66)。

[0227] 如本文所用,“Fab”是指结合抗原但为单价且不具有Fc部分的抗体结构的片段,例如,由木瓜蛋白酶消化的抗体产生两个Fab片段和一个Fc片段(例如,重(H)链恒定区;不结合抗原的Fc区)。

[0228] 如本文所用,“F(ab')₂”是指通过胃蛋白酶消化整个IgG抗体产生的抗体片段,其中此片段具有两个抗原结合(ab') (二价)区,其中每个(ab')区包含两条单独的氨基酸链,由S—S键连接的H链和轻(L)链的部分用于结合抗原,并且其中其余的H链部分连接在一起。一个F(ab')₂片段可分成两个独立的Fab'片段。

[0229] 在一些实施方式中,抗原结合结构域可源自相同物种,CAR最终将会用于该物种中。例如,对于在人中使用,CAR的抗原结合结构域可包含人抗体或其片段。在一些实施方式中,抗原结合结构域可源自最终将使用CAR的不同物种。例如,对于在人中使用,CAR的抗原结合结构域可包含鼠抗体或其片段,或其人源化鼠抗体或片段。

[0230] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区和包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。在某些实施方式中,HCDR1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,和/或HCDR2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,和/或HCDR3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,和/或LCDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,和/或LCDR2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,和/或LCDR3包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0231] 在某些实施方式中,抗原结合结构域的重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,和/或轻链可变区(VL)包含与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0232] 在某些实施方式中,抗原结合结构域是单链可变片段(scFv),其包含与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0233] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括连接体。在某些实施方式中,连接体包括SEQ ID NO:125。

[0234] 本领域技术人员将已知抗原结合结构域序列的容许的变化。例如,在一些实施方

式中,抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、16、112、114和125中任一列出的任一个氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0235] 跨膜结构域

[0236] 本发明的CAR可包括将CAR的抗原结合结构域与CAR的胞内结构域连接的跨膜结构域。CAR的跨膜结构域是能够跨越细胞(例如,免疫细胞或其前体)的质膜的区域。跨膜结构域用于插入细胞膜,例如真核细胞膜中。在一些实施方式中,跨膜结构域插入在CAR的抗原结合结构域与胞内结构域之间。

[0237] 在一些实施方式中,跨膜结构域天然地与CAR中的一个或多个结构域缔合。在一些实施方式中,可以选择或通过一个或多个氨基酸取代修饰跨膜结构域,以避免这样的结构域与相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与受体复合物的其它成员的相互作用。

[0238] 跨膜结构域可以源自天然或合成来源。在天然来源的情况下,该结构域可源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白,例如,I型跨膜蛋白。在合成来源的情况下,跨膜结构域可以是促进CAR插入细胞膜的任意人工序列,例如,人工疏水序列。本发明中具体应用的跨膜结构域的实例非限制地包括源自以下的跨膜结构域(即,包含以下的至少跨膜区(一个或多个)):T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134(OX-40)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS(CD278)、To1L样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0239] 在某些实施方式中,跨膜结构域包括CD8的跨膜结构域。在某些实施方式中,CD8的跨膜结构域是CD8 α 的跨膜结构域。在某些实施方式中,跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

[0240] 在一些实施方式中,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,它将主要包括疏水残基如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成跨膜结构域的每一端将会存在苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0241] 本文所述的跨膜结构域可与本文所述的任何抗原结合结构域、本文所述的任何胞内结构域或本文所述的可包括在CAR中的任何其它结构域组合。

[0242] 在一些实施方式中,跨膜结构域还包括铰链区。本发明的CAR还可以包括铰链区。CAR的铰链区是位于抗原结合结构域与跨膜结构域之间的亲水区。在一些实施方式中,此结构域促进CAR的适当的蛋白质折叠。铰链区是CAR的任选组分。铰链区可以包括选自抗体的Fc片段、抗体的铰链区、抗体的CH2区、抗体的CH3区、人工铰链序列或其组合的结构域。铰链区的实例非限制地包括CD8a铰链、由可短至三个甘氨酸(Gly)的多肽制成的人工铰链以及IgG(如人IgG4)的CH1和CH3结构域。

[0243] 在一些实施方式中,本公开的CAR包括铰链区,该铰链区将抗原结合结构域与进而连接至胞内结构域的跨膜结构域连接。铰链区优选地能够支撑抗原结合结构域以识别并结合靶细胞上的靶抗原(参见,例如,Hudecek et al.,Cancer Immunol.Res.(2015) 3(2): 125-135)。在一些实施方式中,铰链区是柔韧性的结构域,因此允许抗原结合结构域具有最

佳识别细胞如肿瘤细胞上靶抗原的特异性结构和密度的结构(Hudecek et al.,同上)。铰链区的柔韧性允许铰链区采用许多不同的构象。

[0244] 在一些实施方式中,铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。在一些实施方式中,铰链区是源自受体的铰链区多肽(例如,源自CD8的铰链区)。在某些实施方式中,铰链区是CD8 α 铰链。在某些实施方式中,铰链区包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

[0245] 铰链区可具有如下长度:约4个氨基酸至约50个氨基酸,例如,约4个aa至约10个aa、约10个aa至约15个aa、约15个aa至约20个aa、约20个aa至约25个aa、约25个aa至约30个aa、约30个aa至约40个aa或约40个aa至约50个aa。在一些实施方式中,铰链区可以具有如下长度:大于5aa、大于10个aa、大于15个aa、大于20个aa、大于25个aa、大于30个aa、大于35个aa、大于40个aa、大于45个aa、大于50个aa、大于55个aa或更多。

[0246] 合适的铰链区可以容易地选择并且可以是许多合适长度中的任一个,如1个氨基酸(例如,Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。合适的铰链区可以具有大于20个氨基酸(例如,30、40、50、60个或更多个氨基酸)的长度。

[0247] 例如,铰链区包括甘氨酸多聚体(G)_n、甘氨酸-丝氨酸多聚体(包括,例如,(GS)_n、(GSGS)_n(SEQ ID NO:115)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:116),其中n是至少是一的整数)、甘氨酸-丙氨酸多聚体、丙氨酸-丝氨酸多聚体和本领域已知的其它柔韧性连接体。可以使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸多聚体;Gly和Ser两者是相对非结构的(unstructured),因此可以充当组分之间的中性拴序列(neutral tether)。可以使用甘氨酸多聚体;甘氨酸实现比均一的丙氨酸显著更多的 Φ - Ψ (phi-psi)空间,并且比具有较长侧链的残基受到的限制要少得多(参见,例如,Scheraga,Rev.Computational.Chem.(1992)2:73-142)。示例性铰链区可包含氨基酸序列,该氨基酸序列包括但不限于(GGGGS)_n(SEQ ID NO:117)、GGSG(SEQ ID NO:118)、GGSGG(SEQ ID NO:119)、GSGSG(SEQ ID NO:120)、GSGGG(SEQ ID NO:121)、GGGSG(SEQ ID NO:122)、GSSSG(SEQ ID NO:123)、GGGS(SEQ ID NO:124)等。

[0248] 在一些实施方式中,铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域已知的;参见,例如,Tan et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1990)87(1):162-166;和Huck et al.,Nucleic Acids Res.(1986)14(4):1779-1789。作为非限制性实例,免疫球蛋白铰链区可包括以下氨基酸序列中的一个:DKTHT(SEQ ID NO:132);CPPC(SEQ ID NO:133);CPEPKSCDTPPPCPR(SEQ ID NO:134)(参见,例如,Glaser et al.,J.Biol.Chem.(2005)280:41494-41503);ELKTPLGDTTHT(SEQ ID NO:135);KSCDKTHTCP(SEQ ID NO:136);KCCVDCP(SEQ ID NO:137);KYGPPCP(SEQ ID NO:138);EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:139)(人IgG1铰链);ERKCCVECP(CP)(SEQ ID NO:140)(人IgG2铰链);ELKTPLGDTTHTCP(CP)(SEQ ID NO:141)(人IgG3铰链);SPNMVPHAHHAQ(SEQ ID NO:142)(人IgG4铰链);等。

[0249] 铰链区可包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区的氨基酸序列。在一个实施方式中,铰链区相比于野生型(天然存在的)铰链区可包括一个或多个氨基酸取代和/或插入和/或缺失。例如,人IgG1铰链的His229可用Tyr取代,使得该铰链区包含序列EPKSCDKTYT(CP)(SEQ ID NO:143);参见,例如,Yan et al.,J.Biol.Chem.(2012)287:5891-5897。在一个实

施方式中,铰链区可包括源自人CD8的氨基酸序列或其变体。

[0250] 胞内信号传导结构域

[0251] 本发明的CAR还包括胞内信号传导结构域。术语“胞内信号传导结构域”和“胞内结构域”在本文中可互换使用。CAR的胞内信号传导结构域负责激活表达CAR的细胞(例如,免疫细胞)的至少一种效应物功能。胞内信号传导结构域转导效应物功能信号并指导细胞(例如,免疫细胞)执行其专门的功能,例如,伤害和/或毁坏靶细胞。

[0252] 用于本发明的胞内结构域的实例包括但不限于表面受体的胞质部分、共刺激分子和一致作用以发起T细胞中信号转导的任意分子,以及这些元件的任意衍生物或变体和具有相同功能能力的任意合成序列。

[0253] 胞内信号传导结构域的实例非限制性地包括T细胞受体复合物的 ζ 链或其任意同系物,例如, η 链、Fc γ RI γ 和 β 链、MB 1(Ig α)链、B29(Ig)链等、人CD3 ζ 链、CD3多肽(Δ 、 δ 和 ϵ)、syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等),以及参与T细胞转导的其它分子,如CD2、CD5和CD28。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域可以是人CD3 ζ 链、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾区、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞质受体及其组合。

[0254] 在一个实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包括一种或多种共刺激分子的任意部分,诸如来自CD2、CD3、CD8、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、PD-1、其任意衍生物或变体、其具有相同功能能力的任意合成序列及其任意组合的至少一个信号传导结构域。

[0255] 胞内信号传导结构域的其它实例包括来自一种或多种分子或受体的片段或结构域,包括但不限于TCR、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、通用FcR γ 、FcR β (Fc ϵ RIb)、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa、DAP10、DAP12、T细胞受体(TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIR家族蛋白、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(触觉(Tactile))、CEACAM1、CRT AM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、To11样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、本文所述的其它共刺激分子、其任何衍生物、变体或片段、具有相同作用能力的共刺激分子的任何合成序列及其任意组合。

[0256] 胞内信号传导结构域的其它实例非限制地包括若干类型的各种其它免疫信号传导受体的胞内信号传导结构域,包括但不限于第一代、第二代和第三代T细胞信号传导蛋白,其包括CD3、B7家族共刺激和肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族受体(参见,例如,Park和Brentjens, J. Clin. Oncol. (2015) 33(6):651-653)。另外,胞内信号传导结构域可包括NK细胞与NKT细胞所用的信号传导结构域(参见,例如,Hermanson和Kaufman, Front. Immunol. (2015) 6:195),如NKp30(B7-H6)的信号传导结构域(参见,例如,Zhang et al., J. Immunol. (2012) 189(5):2290-2299),以及DAP 12(参见,例如,Topfer et al., J. Immunol. (2015)

194(7):3201-3212)、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10和CD3z的信号传导结构域。

[0257] 适用于本发明的CAR的胞内信号传导结构域包括响应于CAR的激活(即,由抗原和二聚化剂激活)提供有区别的且可检测到的信号(例如,该细胞增加产生一种或多种细胞因子;靶基因转录的变化;蛋白质活性的变化;细胞行为的变化,例如,细胞死亡;细胞增殖;细胞分化;细胞存活;细胞信号传导应答的调节;等等)的任意期望的信号传导结构域。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个等)如下所述的ITAM基序。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域不共价地与膜结合CAR连接,而代替地在细胞质中扩散。

[0258] 适用于本发明的CAR的胞内信号传导结构域包括含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞内信号传导多肽。在一些实施方式中,ITAM基序在胞内信号传导结构域中重复两次,其中ITAM基序的第一实例和第二实例彼此相隔6至8个氨基酸。在一个实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含3个ITAM基序。

[0259] 在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的人免疫球蛋白受体,诸如但不限于Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA、FcRL5(参见,例如,Gillis et al.,Front.Immunol.(2014)5:254)。

[0260] 合适的胞内信号传导结构域可以是源自含有ITAM基序的多肽的含有ITAM基序的部分。例如,合适的胞内信号传导结构域可以是来自任意含有ITAM基序的蛋白的含有ITAM基序的结构域。因此,合适的胞内信号传导结构域无需含有其所源自的整个蛋白的整个序列。合适的含有ITAM基序的多肽的实例包括但不限于:DAP12、FCER1G(Fc ϵ 受体I γ 链)、CD3D(CD3 δ)、CD3E(CD3 ϵ)、CD3G(CD3 γ)、CD3Z(CD3 ζ)和CD79A(抗原受体复合物相关蛋白 α 链)。

[0261] 在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自DAP12(也称为TYROBP;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;KARAP;PLOS;DNAX-激活蛋白12;KAR相关蛋白;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;杀伤激活受体相关蛋白;杀伤-激活受体-相关蛋白;等等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自FCER1G(也称为FCRG;Fc ϵ 受体I γ 链;Fc受体 γ -链;fc- ϵ RI- γ ;fcr γ ;fceRl γ ;高亲和力免疫球蛋白 ϵ 受体亚基 γ ;免疫球蛋白E受体,高亲和力 γ 链;等等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自T-细胞表面糖蛋白CD3 δ 链(也称为CD3D;CD3-DELTA;T3D;CD3抗原, δ 亚基;CD3 δ ;CD3d抗原, δ 多肽(TiT3复合物);OKT3, δ 链;T-细胞受体T3 δ 链;T-细胞表面糖蛋白CD3 δ 链;等等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自T-细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链(也称为CD3e、T-细胞表面抗原T3/Leu-4 ϵ 链、T-细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链、AI504783、CD3、CD3 ϵ 、T3e等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自T-细胞表面糖蛋白CD3 γ 链(也称为CD3G、T-细胞受体T3 γ 链、CD3- γ 、T3G、 γ 多肽(TiT3复合物)等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自T-细胞表面糖蛋白CD3 ζ 链(也称为CD3Z、T-细胞受体T3 ζ 链、CD247、CD3-Z、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自CD79A(也称为B-细胞抗原受体复合物相关蛋白 α 链;CD79a抗原(免疫球蛋白相关 α);MB-1膜糖蛋白;ig- α ;膜结合免疫球蛋白相关蛋白;表面IgM相关蛋白;等等)。在一个实施方式中,适用于本公开的FN3 CAR的胞内信号传导结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。在一个实施方式中,适用于本公开的FN3 CAR的胞内信号传导结构域包括ZAP70多肽。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、

CD79a、CD79b或CD66d的胞质信号传导结构域。在一个实施方式中，CAR中的胞内信号传导结构域包括人CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。

[0262] 尽管通常可以使用整个胞内信号传导结构域，但是在许多情况下无需使用整条链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言，这样的截短部分可用于代替完整的链，只要其转导效应物功能信号即可。胞内信号传导结构域包括足以转导效应物功能信号的胞内信号传导结构域的任意截短部分。

[0263] 本文所述的胞内结构域可与本文所述的任意抗原结合结构域、本文所述的任意跨膜结构域或可包括在CAR中的本文所述的任意其它结构域组合。

[0264] 在某些实施方式中，胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域。在某些实施方式中，4-1BB的共刺激结构域包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。在某些实施方式中，胞内结构域包括CD3 ζ 或其变体的胞内结构域。在某些实施方式中，CD3 ζ 的胞内结构域包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。在某些实施方式中，胞内结构域包括4-1BB和CD3 ζ 。在某些实施方式中，胞内结构域包括SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

[0265] 各个CAR结构域序列（前导序列、抗原结合结构域、铰链、跨膜和胞内结构域）的容许的变化将是本领域技术人员已知的。例如，在一些实施方式中，CAR结构域包含与SEQ ID NO:16、32、34、36、38和40中列出的任意氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0266] 一方面，本发明提供嵌合抗原受体（CAR），其包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。在某些实施方式中，CAR包括SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中任一个列出的氨基酸序列。在一些实施方式中，CAR通过可自切割连接体与安全开关连接，并且CAR连接安全开关包括SEQ ID NO:42、52、60、68、76、88和100中列出的氨基酸序列中的任一个。

[0267] CAR序列和CAR连接安全开关序列的容许的变化是本领域技术人员已知的。例如，在某些实施方式中，CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中任一个列出的氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中，CAR连接安全开关包括与SEQ ID NO:42、52、60、68、76、88和100中列出的氨基酸序列中的任一个具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0268] 表1:核苷酸和氨基酸序列

[0269]

A. CCR4 CARs (不含耗竭系统)		
SEQ ID NO: 1	CCR4(KW_L2H) HCDR1 – 核苷酸	
aactacggca tgagc		15
SEQ ID NO: 2	CCR4(KW_L2H) HCDR1 – 氨基酸	
NYGMS		5
SEQ ID NO: 3	CCR4(KW_L2H) HCDR2 – 核苷酸	
acaatcagca gcgccagcac ctacagctac taccccgata gcgtgaaggg c		51
SEQ ID NO: 4	CCR4(KW_L2H) HCDR2 – 氨基酸	
TISSASTYSY YPDSVKG		17
SEQ ID NO: 5	CCR4(KW_L2H) HCDR3 – 核苷酸	
cacagcgacg gcaacttcgc ctttggtat		30
SEQ ID NO: 6	CCR4(KW_L2H) HCDR3 – 氨基酸	
HSDGNFAFGY		10

[0270]

SEQ ID NO: 7	CCR4(KW_L2H) LCDR1 – 核苷酸	
agatccagcc ggaacatcgt gcacatcaac ggcgacacct acctggaa		48
SEQ ID NO: 8	CCR4(KW_L2H) LCDR1 – 氨基酸	
RSSRNIVHIN GDTYPE		16
SEQ ID NO: 9	CCR4(KW_L2H) LCDR2 – 核苷酸	
aaggtgtcca accggttcag c		21
SEQ ID NO: 10	CCR4(KW_L2H) LCDR2 – 氨基酸	
KVSNRFS		7
SEQ ID NO: 11	CCR4(KW_L2H) LCDR3 – 核苷酸	
ttccaaggct ctctgctgcc ctggaca		27
SEQ ID NO: 12	CCR4(KW_L2H) LCDR3 – 氨基酸	
FQGSLLPWT		9
SEQ ID NO: 111	CCR4(KW_L2H) VH 链 – 核苷酸	
gaagttcagc tggttgagtc tggcggcgac ctggttcagc ctggcagatc tctgagactg		60
agctgtgccg ccagcggtt catcttcagc aactacggca tgagctgggt ccgacaggcc		120
cctggaaaag gactggaatg ggtcgccaca atcagcagcg ccagcaccta cagctactac		180
cccgatagcg tgaaggcgag attcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac		240
ctgcagatga actccctgcg cgtggaagat acagccctgt actattgcgg cagacacagc		300
gacggcaact tcgcctttgg ctattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ttctagt		357
SEQ ID NO: 112	CCR4(KW_L2H) VH 链 – 氨基酸	
EVQLVESGGD LVQPGRSLRL SCAASGFIFS NYGMSWVRQA PGKGLEWVAT ISSASTYSYY		60
PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRVED TALYICGRHS DGNFAFGYWG QGTLVTVSS		119
SEQ ID NO: 113	CCR4(KW_L2H) VL 链 – 核苷酸	
gacgtgctga tgacacagag ccctctgagc ctgcctgtga cacctggcga acctgccagc		60
atcagctgca gatccagccg gaacatcgtg cacatcaacg ggcacaccta cctggaatgg		120
tatctgcaga agcccgcca gtctctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc		180
agcggcgtgc ccgatagatt ttctggcagc ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc		240
tccagagtgg aagccgagga cgtggcggtg tactactgct tccaaggctc tctgctgcc		300
tggacatttg gccagggcac caaggtggaa atcaag		336
SEQ ID NO: 114	CCR4(KW_L2H) VL 链 – 氨基酸	
DVLMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSRNIV HINGDTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNR		60
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCFQGSLLP WTFGQGTKVE IK		112
SEQ ID NO: 13	CCR4(KW_H2L) scFv – 核苷酸	
gaagtgcagc tggttgagtc tggcggagat ctggtgcagc ctggcagaag cctgagactg		60
tcttgtgccg ccagcggtt catcttcagc aactacggca tgagctgggt ccgacaggcc		120
cctggaaaag gccttgaatg ggtcgccaca atcagcagcg ccagcaccta cagctactac		180
cccgatagcg tgaaggcgag attcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac		240
ctgcagatga actccctgcg cgtggaagat acagccctgt actactgcgg cagacacagc		300
gacggcaatt tcgcctttgg ctattggggc cagggcacc cttgtaccgt ttctagcgg		360
ggaggtggat caggtggagg tggaaagcgg ggaggaggtt ccggcggcgg aggatcagat		420
gttctgatga cacagagccc tctgagcctg cctgtgacac ctggcgaacc tgccagcatc		480
agctgcagat ccagccggaa catcgtgcac atcaacggcg acacctacct ggaatggtat		540
ctgcagaagc ccggccagtc tctcagctg ctgatctaca aggtgtccaa ccggttcagc		600
ggcgtgcccg atagatttcc tggcagcggc tctggcaccg acttcaccct gaagatctcc		660
agagtggaa cggagagcgt gggcgtctac tactgcttcc aaggctctct gctgccctgg		720
acatttgga cagggaccaa ggtggaatc aag		753
SEQ ID NO: 14	CCR4(KW_H2L) scFv – 氨基酸	
EVQLVESGGD LVQPGRSLRL SCAASGFIFS NYGMSWVRQA PGKGLEWVAT ISSASTYSYY		60
PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRVED TALYICGRHS DGNFAFGYWG QGTLVTVSSG		120
GGGSGGGGSG GGGSGGGGSD VLMTQSPLSL PVTGEPASI SCRSSRNIVH INGDTYLEWY		180
LQKPGQSPQL LIYKVSNRFS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDGVV YCFQGSLLPW		240
TFGQGTKVEI K		251
SEQ ID NO: 15	CCR4(KW_L2H) scFv – 核苷酸	
gacgtgctga tgacacagag ccctctgagc ctgcctgtga cacctggcga acctgccagc		60
atcagctgca gatccagccg gaacatcgtg cacatcaacg ggcacaccta cctggaatgg		120
tatctgcaga agcccgcca gtctctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc		180

[0271]

agcggcgtgc	ccgatagatt	ttctggcagc	ggctctggca	ccgacttcac	cctgaagatc	240
tccagagtgg	aagccgagga	cgtgggcgtg	tactactgct	tccaaggctc	tctgctgccc	300
tggacatttg	gccagggcac	caaggtggaa	atcaagggag	gaggtggatc	aggtggaggt	360
ggaagcgggg	gaggaggttc	cggcggcgga	ggatcagaag	ttcagctggg	tgagtctggc	420
ggcgacctgg	ttcagcctgg	cagatctctg	agactgagct	gtgccgccag	cggcttcac	480
ttcagcaact	acggcatgag	ctgggtccga	caggccccctg	gaaaaggact	ggaatgggtc	540
gccacaatca	gcagcgccag	cacctacagc	tactaccccg	atagcgtgaa	gggcagattc	600
accatcagcc	gggacaacgc	caagaacagc	ctgtacctgc	agatgaactc	cctgcgcgtg	660
gaagatacag	ccctgtacta	ttgcggcaga	cacagcgacg	gcaacttcgc	ctttggctat	720
tggggccagg	gaaccttggt	caccgtttct	agt			753
SEQ ID NO: 16 CCR4(KW_L2H) scFv - 氨基酸						
DVLMTQSPLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSRNIV	HINGDTYLEW	YLQKPGQSPQ	LLIYKVSNRF	60
SGVPDRFSGS	SGGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCFQGSLLP	WTFGQGTVKE	IKGGGSGGG	120
SGGGGSGGG	GSEVQLVESG	GDLVQPGRL	RLSAAASGFI	FSNYGMSWVR	QAPGKGLEWV	180
ATISSASTYS	YYPDSVKGRF	TISRDNAKNS	LYLQMNLSRV	EDTALYYCGR	HSDGNFAFGY	240
WGQTLTVTS	S					251
SEQ ID NO: 17 CCR4(1-49_H2L) scFv - 核苷酸						
caggtgcagc	tggtgcagag	cggagccgag	gtgaagaagc	ctggagcttc	cgtcaaggtg	60
tcctgcaagg	ccagcggtta	caccttcgcc	agcagctgga	tgactggat	gcggcaggca	120
cctggacagg	gectcgaatg	gacggctgg	atcaaccccg	gcaacgtgaa	caccaagtac	180
aacgagaagt	tcaaggcgag	ggccaccctg	accgtggaca	ccagcaccaa	caccgcctac	240
atggaactga	gcagcctgcg	gagcgaggac	accgccgtgt	actactgcgc	cagaagcacg	300
tggtatcgcc	cgaatgacta	ctggggccag	ggcacccctg	tgaccgtgag	cagcggagga	360
ggtggatcag	gtggaggtgg	aagcggggga	ggaggttcgc	gcggcggagg	atcacagatc	420
gtgatgaccc	agagccccga	cagcctggcc	gtgagcctgg	gcgagcgggc	caccatcaac	480
tgcaagagca	gccagagcat	cctgtacagc	agcaaccaga	agaactacct	ggcctgggtat	540
cagcagaagc	ccggccagag	ccccaaactg	ctgatctact	gggccagcac	ccgggagagc	600
ggcgtgcccg	accggtttag	cggcagcggc	tccggcaccg	acttcaccct	gaccatcagc	660
agcctgcagg	ccgagagcgt	ggccgtgtac	tactgccacc	agtacaaaag	cagctacacc	720
ttcgccagg	gcacaaagct	ggaaatcaag				750
SEQ ID NO: 18 CCR4(1-49_H2L) scFv - 氨基酸						
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFA	SSWMHWMRQA	PGQGLEWIGW	INPGNVNTKY	60
NEKFKGRATL	TVDTSTNTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARST	WYRPNDYWGQ	GTLVTVSSGG	120
GGSGGGSGGG	GGSGGGGSDI	VMTQSPDSL	VSLGERATIN	CKSSQSILYS	SNQKNYLAWY	180
QQKPGQSPKL	LIYWASTRES	GVPDRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVY	YCHQYKSSYT	240
FGQGTKLEIK						250
SEQ ID NO: 19 CCR4(1-49_L2H) scFv - 核苷酸						
gacatcgtga	tgaccagag	ccccgacagc	ctggccgtga	gcctgggcca	gcgggccacc	60
atcaactgca	agagcagcca	gagcatcctg	tacagcagca	accagaagaa	ctacctggcc	120
tggtatcagc	agaagcccgg	ccagagcccc	aagctgctga	tctactgggc	cagcaccggg	180
gagagcggcg	tgcccgaccg	gtttagcggc	agcggctccg	gcaccgactt	cacctgacc	240
atcagcagcc	tgacggccga	ggacgtggcc	gtgtactact	gccaccagta	caaaagcagc	300
tacaccttcg	gccagggcac	aaagctggaa	atcaagggag	gaggtggatc	aggtggaggt	360
ggaagcgggg	gaggaggttc	cggcggcgga	ggatcacagg	tgacagctgg	gcagagcgga	420
gccaggtgga	agaagcctgg	agcttcctgc	aaggtgtcct	gcaaggccag	cggctacacc	480
ttcgccagca	gctggatgca	ctggatgcgg	caggcacctg	gacagggcct	cgaatggatc	540
ggctggatca	accccgccaa	cgtgaacacc	aagtacaacg	agaagttcaa	gggcagggcc	600
accctgaccg	tggaaccag	caccaacacc	gcctacatgg	aactgagcag	cctgcggagc	660
gaggacaccg	ccgtgtacta	ctgcggcaga	agcacgtggg	atcgcccgaa	tgactactgg	720
ggccaggcca	ccctggtgac	cgtgagcagc				750
SEQ ID NO: 20 CCR4(1-49_L2H) scFv - 氨基酸						
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSIL	YSSNQKNYLA	WYQKPGQSP	KLLIYWASTR	60
ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCHQYKSS	YTFGQGTKLE	IKGGGSGGG	120
SGGGGSGGG	GSQVQLVQSG	AEVKKPGASV	KVSKASGYT	FASSWMHWMR	QAPGQGLEWI	180
GWINPGNVNT	KYNEKFKGRA	TLTVDSTNT	AYMELSSLR	EDTAVYYCAR	STWYRPNDYW	240
GQGLTVTVSS						250
SEQ ID NO: 21 CCR4(2-3_H2L) scFv - 核苷酸						
caggtgcagc	tggtgcagag	cggagccgag	gtgaagaagc	ctggagcttc	cgtcaaggtg	60

[0272]

tcctgcaagg	ccagcggcta	caccttcgcc	agcgcgtgga	tgcactggat	gcggcaggca	120
cctggacagg	gcctcgaatg	gatcggctgg	atcaaccccg	gcaacgtgaa	caccaagtac	180
aacgagaagt	tcaagggcag	ggccaccctg	accgtggaca	ccagcaccaa	caccgcctac	240
atggaactga	gcagcctgcg	gagcaggac	accgccgtgt	actactgcmc	cagaagcacg	300
tattaccggc	cgctggacta	ctggggccag	ggcacccctg	tgaccgtgag	cagcggagga	360
ggtggatcag	gtggagggtg	aagcggggga	ggaggttccg	gcggcggagg	atcagacatc	420
gtgatgaccc	agagccccga	cagcctggcc	gtgagcctgg	gcgagcgggc	caccatcaac	480
tgcaagagca	gccagagcat	cctgtacagc	agcaaccaga	agaactacct	ggcctgggat	540
cagcagaagc	ccggccagag	ccccaaactg	ctgatctact	gggccagcac	ccgggagagc	600
ggcgtgcccg	accggtttag	cggcagcggc	tccggcaccg	acttcaccct	gaccatcagc	660
agcctgcagg	ccgaggacgt	ggcctgttac	tactgccacc	agtacatgag	cagctacacc	720
ttcggccagg	gcacaaagct	ggaaatcaag				750
SEQ ID NO: 22		CCR4(2-3 H2L) scFv – 氨基酸				
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFA	SAWMHWMRQA	PGQGLEWIGW	INPGNVNTKY	60
NEKFKGRATL	TVDTSTNTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARST	YRPLDYWGQ	GLTVTVSSGG	120
GGSGGGGSGG	GGSGGGGSDI	VMTQSPDSL	VSLGERATIN	CKSSQSILYS	SNQKNYLAWY	180
QKPKQSPKL	LIYWASTRES	GVPDRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVY	YCHQYMSSYT	240
FGQGTKLEIK						250
SEQ ID NO: 23		CCR4(2-3 L2H) scFv – 核苷酸				
gacatcgtga	tgaccacagag	ccccgacagc	ctggccgtga	gcctggggcga	gcggggccacc	60
atcaactgca	agagcagcca	gagcatcctg	tacagcagca	accagaagaa	ctacctggcc	120
tggtatcagc	agaagcccgg	ccagagcccc	aagctgctga	tctactgggc	cagcaccogg	180
gagagcggcg	tgcccagacc	gtttagcggc	agcggctccg	gcaccgactt	caccctgacc	240
atcagcagcc	tgacggccga	ggacgtggcc	gtgtactact	gccaccagta	catgagcagc	300
tacaccttcg	gccagggcac	aaagctggaa	atcaaggagag	gaggtggatc	aggtggaggt	360
ggaagcgggg	gaggaggttc	cggcggcgga	ggatcacagg	tgacgtggtt	gcagagcggga	420
gccaggtgga	agaagcctgg	agcttcctgc	aaggtgtcct	gcaaggccag	cggctacacc	480
ttcggcagcg	cgtggatgca	ctggatcgcg	caggcacctg	gacagggcct	cgaatggatc	540
ggctggatca	accccggcaa	cgtgaacacc	aagtacaacg	agaagttcaa	gggcagggcc	600
accctgaccg	tggacaccag	caccaacacc	gcctacatgg	aactgagcag	cctgcggagc	660
gaggacaccg	ccgtgtacta	ctgcgcagga	agcacgtatt	accggccgct	ggactactgg	720
ggccagggca	ccctggtgac	cgtgagcagc				750
SEQ ID NO: 24		CCR4(2-3 L2H) scFv – 氨基酸				
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSIL	YSSNQKNYLA	WYQQKPGQSP	KLLIYWASTR	60
ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCHQYMSS	YTFGQGTKLE	IKGGGGSGGG	120
GSQVQLVQSG	AEVKKPGASV	KVSKASGYT	FASAWMHWMR	QAPGQGLEWI		180
GWINPGNVNT	KYNEKFKGRA	TLTVDTSTNT	AYMELSSLRS	EDTAVYYCAR	STYYRPLDYW	240
GQGTSLTVSS						250
SEQ ID NO: 25		CCR4(h1567 H2L) scFv – 核苷酸				
caggtgcagc	tggtgcagag	cggagccgag	gtgaagaagc	ctggagcttc	cgtcaagggtg	60
tcctgcaagg	ccagcggcta	caccttcgcc	agctactaca	tgcactggat	gcggcaggca	120
cctggacagg	gcctcgaatg	gatcggctgg	atcaaccccg	gcaacgtgaa	caccaagtac	180
aacgagaagt	tcaagggcag	ggccaccctg	accgtggaca	ccagcaccaa	caccgcctac	240
atggaactga	gcagcctgcg	gagcaggac	accgccgtgt	actactgcmc	cagaagcacc	300
tactaccggc	ccctggacta	ctggggccag	ggcacccctg	tgaccgtgag	cagcggagga	360
ggtggatcag	gtggagggtg	aagcggggga	ggaggttccg	gcggcggagg	atcagacatc	420
gtgatgaccc	agagccccga	cagcctggcc	gtgagcctgg	gcgagcgggc	caccatcaac	480
tgcaagagca	gccagagcat	cctgtacagc	agcaaccaga	agaactacct	ggcctgggat	540
cagcagaagc	ccggccagag	ccccaaactg	ctgatctact	gggccagcac	ccgggagagc	600
ggcgtgcccg	accggtttag	cggcagcggc	tccggcaccg	acttcaccct	gaccatcagc	660
agcctgcagg	ccgaggacgt	ggcctgttac	tactgccacc	agtacctgag	cagctacacc	720
ttcggccagg	gcacaaagct	ggaaatcaag				750
SEQ ID NO: 26		CCR4(h1567 H2L) scFv – 氨基酸				
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFA	SYMHWMRQA	PGQGLEWIGW	INPGNVNTKY	60
NEKFKGRATL	TVDTSTNTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARST	YRPLDYWGQ	GLTVTVSSGG	120
GGSGGGGSGG	GGSGGGGSDI	VMTQSPDSL	VSLGERATIN	CKSSQSILYS	SNQKNYLAWY	180
QKPKQSPKL	LIYWASTRES	GVPDRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQAEDVAVY	YCHQYLSSYT	240
FGQGTKLEIK						250

[0273]

SEQ ID NO: 27	CCR4(h1567 L2H) scFv - 核苷酸					
gacatcgtga	tgaccacagag	ccccgacagc	ctggccgtga	gcctgggcca	gcggggccacc	60
atcaactgca	agagcagcca	gagcatcctg	tacagcagca	accagaagaa	ctacctggcc	120
tggtatcagc	agaagcccgg	ccagagcccc	aagctgctga	tctactgggc	cagcaccggg	180
gagagcggcg	tgcccgaccg	gtttagcggc	agcggctccg	gcaccgactt	cacctgacc	240
atcagcagcc	tgacggccga	ggacgtggcc	gtgtactact	gccaccagta	cctgagcagc	300
tacaccttcg	gccagggcac	aaagctggaa	atcaagggag	gaggtggatc	aggtggaggt	360
ggaagcgggg	gaggaggttc	cggcggcgga	ggatcacagg	tcagctggt	gcagagcggg	420
gccaggtga	agaagcctgg	agcttcctgc	aaggtgtcct	gcaaggccag	cggctacacc	480
ttcgccagct	actacatgca	ctggatcgcg	caggcacctg	gacagggcct	cgaatggatc	540
ggctggatca	accccgga	cgtgaacacc	aagtacaacg	agaagttcaa	gggcagggcc	600
acctgaccg	tggacaccag	caccaacacc	gcctacatgg	aactgagcag	cctgcggagc	660
gaggacaccg	ccgtgtacta	ctgcgcagga	agcacctact	accggcccct	ggactactgg	720
ggccagggca	ccctggtgac	cgtgagcagc				750
SEQ ID NO: 28	CCR4(h1567 L2H) scFv - 氨基酸					
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSIL	YSSNQKNYLA	WYQQKPGQSP	KLLIYWASTR	60
ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCHQYLSS	YTFGQGTKLE	IKGGGSGGGG	120
SGGGGSGGGG	GSQVQLVQSG	AEVKKPGASV	KVSCASGYT	FASYMHWMR	QAPGQGLEWI	180
GWINPGNVNT	KYNEFKGRA	TLTVDSTNT	AYMELSSLRS	EDTAVYYCAR	STYYRPLDYW	240
GQGLVTVSS						250
SEQ ID NO: 29	CCR4(KW L2H) CAR - 核苷酸					
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	cgccgctgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggaggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtcctggc	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgcagc	acctacagct	actaccgga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacgcc	tgtacctgca	gactgaactc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggtattt	ggggccaggg	aacctgggtc	accgtttcta	gttcgggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgcag	caccaacacc	ggcgcgccac	atcgctgcgc	agcccctgtc	cctgcgcca	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cctggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
ctgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tcagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgga	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tgccggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgctaa	1500
SEQ ID NO: 30	CCR4(KW L2H) CAR - 氨基酸					
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDF	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSGSEQLV	ESGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSRFPFEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEDY	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHGDLQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPR					499
SEQ ID NO: 31	CD8 前导 - 核苷酸					
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60

[0274]

CCC	63
SEQ ID NO: 32	CD8 前导 – 氨基酸
MALPVTALLL PLALLLHAAR P	21
SEQ ID NO: 33	CD8 铰链 – 核苷酸
accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca cggcgccca ccatcgcgtc gcagccctg	60
tccctgcgc cagagcgctg cggccagcg gggggggcg cagtgcacac gggggggctg	120
gacttcgct gtgat	135
SEQ ID NO: 34	CD8 铰链 – 氨基酸
TTTPAPRPPT PAPTIASQPL SLRPEACRPA AGGAVHTRGL DFACD	45
SEQ ID NO: 35	CD8 跨膜 – 核苷酸
atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggctc ttctcctgtc actggttatc	60
accctttact gc	72
SEQ ID NO: 36	CD8 跨膜 – 氨基酸
IYIWAPLAGT CGVLLLSLVI TLYC	24
SEQ ID NO: 37	4-1BB 胞内结构域 – 核苷酸
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa	60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt	120
gaactg	126
SEQ ID NO: 38	4-1BB 胞内结构域 – 氨基酸
KRGRKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEGGC EL	42
SEQ ID NO: 39	CD3 ζ – 核苷酸
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc	60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc	120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc	300
tacgagcccc ttacatgca ggcctgccc cctcgctaa	339
SEQ ID NO: 40	CD3 ζ – 氨基酸
RVKFSRSADA PAYKQQNQL YNELNLGRRE EYDVLDRRG RDPFMGGKPR RKNPQEGLYN	60
ELQDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDT YDALHMQALP PR	112
B. CCR4(KW_L2H)截短的 EGFR (tEGFR) 耗竭系统	
SEQ ID NO: 41	CCR4(KW_L2H)-tEGFR – 核苷酸
atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
cccgatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa	120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac	180
ctggaatggt atctgcagaa gcccggccag tctctcagc tgctgatcta caaggtgtcc	240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc	300
ctgaagatct ccagagtggg agccgaggac gtggcgctgt actactgctt ccaaggctct	360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca	420
ggtggaggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt	480
gagtctggcg gcgacctgt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc	540
ggcttcactt tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac agggccctgg aaaaggactg	600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccgga tagcgtgaag	660
ggcagattca ccacagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc	780
tttggctatt ggggcccagg aacctgtgt accgtttcta gttccggaac cagcagcca	840
gcgcgcgac caccacacc ggcgccacc atcgctcgc agccctgtc cctgcgcca	900
gaggcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacagc gggggctgga cttcgccctgt	960
gatatctaca tctggcgcc cttggccggg acttgtgggg tctttctct gtcactggtt	1020
atcacccttt actgcaaagc gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt	1080
atgagaccag tacaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa	1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac	1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat	1260
gttttggaaca agagacgtgg ccggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac	1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcgagggc ctacagttag	1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc	1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgccc cctcgccat	1500

atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagaac	1560
cctggaccta	tgcttctcct	ggtgacaagc	cttctgctct	gtgagttacc	acaccagca	1620
ttctctctga	tcccacgcaa	agtgtgtaac	ggaataggta	ttggtgaatt	taaagactca	1680
ctctccataa	atgctacgaa	tattaaacac	ttcaaaaact	gcacctccat	cagtggcgat	1740
ctccacatcc	tgccggtggc	atthaggggt	gactccttca	cacatactcc	tcctctggac	1800
ccacaggaac	tgatatttct	gaaaaccgta	aaggaaatca	caggggtttt	gctgattcag	1860
gcttggcctg	aaaacaggac	ggacctccat	gcctttgaga	acctagaaat	catacgcggc	1920
aggaccaagc	aacatggtca	gttttctctt	gcagtcgtca	gcctgaacat	aacatccttg	1980
ggattacgct	ccctcaagga	gataagtgat	ggagatgtga	taatttcagg	aaacaaaaat	2040
ttgtgctatg	caaatacaat	aaactggaaa	aaactgtttg	ggacctccgg	tcagaaaacc	2100
aaaattataa	gcaacagagg	tgaaaacagc	tgcaaggcca	caggccaggt	ctgccatgcc	2160
ttgtgctccc	ccgagggctg	ctggggcccg	gagcccaggg	actgcgtctc	ttgccggaat	2220
gtcagccgag	gcagggaatg	cgtggacaag	tgcaaccttc	tggaggggtga	gccaagggag	2280
tttgtggaga	actctgagtg	catacagtcg	cacctcaggt	gcctgcctca	ggccatgaac	2340
atcacctgca	caggacgggg	accagacaac	tgtatccagt	gtgcccacta	cattgcaggc	2400
ccccactcgc	tcaagacctg	ccccggcagg	gtcatgggag	aaaacaacac	cctggctctgg	2460
aagtaacgag	acgccggcca	tgtgtgccac	ctgtgccatc	caaactgcac	ctacggatgc	2520
actgggccag	gtcttgaagg	ctgtccaacg	aatgggccta	agatcccgtc	catcgccact	2580
gggatggtgg	gggcctcctc	cttgcctgctg	gtggtggccc	tggggatcgg	cctcttcatg	2640
tag						2643
SEQ ID NO: 42		CCR4(KW_L2H)-tEGFR - 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLYKVS	NRFSGVDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGVYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGS	GGGSGGGGS	GGGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGGTLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAFLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSRFPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPRH	MMSGATNFSL	LKQAGDVEEN	PGPMLLLVTS	LLLCPLHPHA	540
FLLIPRKVCN	GIGIGEFKDS	LSINATNIKH	FKNCTISISGD	LHILPVAFRG	DSFHTPPPLD	600
PQELDILKTV	KEITGFLLIQ	AWPENRTDLH	AFENLEIIRG	RTKQHGQFSL	AVVSLNITSL	660
GLRSLKEISD	GDVIISGNKN	LCYANTINWK	KLFGTSGQKT	KIISNRGENS	CKATGQVCHA	720
LCSPEGCWGP	EPRDCVSCRN	VSRGRECVDK	CNLEGEPRE	FVENSECIQC	HPECLPQAMN	780
ITCTGRGPDN	CIQCAHYIDG	PHCVKTCFAG	VMGENNTLVW	KYADAGHVCH	LCHPNCTYGC	840
TGPGLEGCP	NGPKIPSIAT	GMVGALLLLL	VVALGIGLGM			880
SEQ ID NO: 43		CCR4(KW_L2H) CAR - 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccgatcccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aagggtgaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggagggt	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgccggag	gacagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggg	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcagtagc	tgggtccgac	aggccccctg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagatcca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aacctgggtc	accgtttcta	gttccgggac	cacgagccca	840
gcgcccgcgc	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgctgcgc	agccccgtgc	cctgcgccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgagaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggagaac	1320

[0275]

cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtga	1380
atttgggatga	aaggcgagcg	cggaggggc	aaggggcaag	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503
SEQ ID NO: 44		CCR4(KW_L2H) CAR – 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTGGE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDF	SGSGSGTDF	LKISRVEAED	VGVIYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMN	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGGTLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPRH	M				501
SEQ ID NO: 45		P2A – 核苷酸				
ggaagcggag	ctactaactt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaaccct	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 46		P2A – 氨基酸				
GSGATNFSLL	KQAGDVEENP	GP				22
SEQ ID NO: 47		GMSCFR 前导 – 核苷酸				
atgtctctcc	tgggtgacaag	ccttctgctc	tgtgagttac	cacaccagc	attcctcctg	60
atccca						66
SEQ ID NO: 48		GMSCFR 前导 – 氨基酸				
MLLVTSLLL	CELPHPAFLL	IP				22
SEQ ID NO: 49		tEGFR – 核苷酸				
cgcaaatgt	gtaacggaat	aggtattggt	gaatttaaag	actcactctc	cataaatgct	60
acgaatatta	aacacttcaa	aaactgcacc	tccatcagtg	gcgatctcca	catcctgccg	120
gtggcatttta	gggttgactc	cttcacacat	actcctcctc	tggaccacca	ggaactggat	180
attctgaaaa	ccgtaaagga	aatcacaggg	tttttgctga	ttcaggcttg	gcctgaaaaac	240
aggacggacc	tccatgcctt	tgagaacctc	gaaatacatc	gcggcaggac	caagcaacat	300
ggtcagtttt	ctcttcagtg	cgtcagcctg	aacataacat	ccttgggatt	acgtccctc	360
aaggagataa	gtgatggaga	tgtgataatt	tcaggaaaca	aaaattttgtg	ctatgcaa	420
acaataaact	ggaaaaaact	gtttgggacc	tccggtcaga	aaacaaaaat	tataagcaac	480
agaggtgaaa	acagctgcaa	ggccacaggc	caggtctgcc	atgccttggtg	ctcccccgag	540
ggctgctggg	gcccggagcc	cagggactgc	gtctcttgcc	ggaatgtcag	ccgaggcagg	600
gaatgcgtgg	acaagtgcaa	ccttctggag	ggtgagccaa	gggagtttgt	ggagaactct	660
gagtgcatac	agtgccacce	agagtgcctg	cctcaggcca	tgaacatcac	ctgcacagga	720
cggggaccag	acaactgtat	ccagtgtgcc	cactacattg	acggcccca	ctgcgtcaag	780
acctgcccg	caggagtcac	gggagaaaac	aacacctgtg	tctggaagta	cgcagacgcc	840
ggccatgtgt	gccacctgtg	ccatccaaac	tgcacctacg	gatgcactgg	gccaggtctt	900
gaaggtgtgc	caacgaatgg	gcctaagatc	cgtccatcgc	ccactgggat	ggtggggggc	960
ctcctcttgc	tgtgtgtgtg	ggccctgggg	atcgccctct	tcattgtag		1008
SEQ ID NO: 50		tEGFR – 氨基酸				
RKVCNGIGIG	EFKDSLISINA	TNIKHFKNCT	SISGDLHILP	VAFRGDSFTH	TPPLDPQELD	60
ILKTVEKITG	FLLIQAWPEN	RTDLHAFENL	EIIIRGRKQH	GQFSLAVVSL	NITSLGLRSL	120
KEISDGDVII	SGKNLCYAN	TINWKKLFGT	SGQKTKIISN	RGENSCKATG	QVCHALCSPE	180
GCWGPEPRDC	VSCRNVSRGR	ECVDKCNLLE	GEPREFVENS	ECIQCHPECL	PQAMNITCTG	240
RGPDNCIQCA	HYIDGPHCVK	TCPAGVMGEN	NTLVWKYADA	GHVCHLCHPN	CTYGCTGPGL	300
EGCPTNGPKI	PSIATGMVGA	LLLLLVVALG	IGLFM			335
C. CCR4(KW_L2H)-CD20 耗竭系统						
SEQ ID NO: 51		CCR4(KW_L2H)-CD20 – 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgtctgtgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgtgtatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360

[0276]

[0277]

ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgagg	gatcagaaagt	tcagctgggt	480
gagtcgtggcg	gcgacctggg	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctgggc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgac	caccaacacc	ggcgccacc	atcgcgctgc	agcccctgtc	cctgcgccc	900
gagggctgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactgggt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcaggggc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaacttag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaaagaa	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagaac	1560
cctggaccta	tgacaacacc	cagaaattca	gtaaatggga	ctttcccggc	agagccaatg	1620
aaagcccta	ttgctatgca	atctggtcca	aaaccactct	tcaggaggat	gtcttcaactg	1680
gtgggcccc	cgcaatcctt	cttcagtggg	gaatctaaga	ctttgggggc	gttccagatt	1740
atgaatgggc	tcttccacat	tgccttgggg	ggtcttctga	tgatcccgag	agggatctat	1800
gcaccatct	gtgtgactgt	gtggtatcct	ctctggggag	gcattatgta	tattatttcc	1860
ggatcactcc	tggcagcaac	ggagaaaaac	tccaggaagt	gtttggtcaa	aggaaaaatg	1920
ataatgaact	cattgagcct	ctttgctgcc	atcttctggaa	tgattctttc	aatcatggac	1980
atacttaata	ttaaaatttc	ccatttttta	aaaatggaga	gtctgaattt	tatttagagct	2040
cacacaccat	atattaacat	atacaactgt	gaaccactga	atccctctga	gaaaaactcc	2100
ccatctaccc	aatactgtta	cagcatacaa	tctctgttct	tgggcatttt	gtcagttagt	2160
ctgatctttg	ccttcttcca	ggaacttgta	atagctggca	tcgttgagaa	tgaatggaaa	2220
agaacgtgct	ccagacccaa	atctaacata	gttctcctgt	cagcagaaga	aaaaaaagaa	2280
cagactattg	aaataaaaga	agaagtgggt	gggctaactg	aaacatcttc	ccaaccaaag	2340
aatgaagaag	acattgaaat	tattccaatc	caagaagagg	aagaagaaga	aacagagacg	2400
aactttccag	aacctcccca	agatcaggaa	tcttcaccaa	tagaaaaatga	cagctctcct	2460
taa						2463
SEQ ID NO: 52		CCR4(KW_L2H)-CD20 - 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLTQS	PLSLPVTGGE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSQVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSRLRSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQQQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPRH	MSGATNFSL	LKQAGDVEEN	PGPMTTPRNS	VNGTFPAEPM	540
KGPIAMQSGP	KPLFRMSSL	VGPTQSFMR	ESKTLGAVQI	MNGLFHIALG	GLLMIPAGIY	600
APICVTWVYP	LWGGIMYIIS	GSLLAATEKN	SRKCLVKGKM	IMNSLSLFAA	ISGMILSMD	660
ILNIKISHFL	KMESLNFIRA	HTPYINIYNC	EPANPSEKNS	PSTQYCYSIQ	SLFLGILSVM	720
LIFAFFQELV	IAGIVENEWK	RTCSRPKSNI	VLLSAEEKKE	QTIEIKEEVV	GLTETSSQPK	780
NEEDIEIPI	QEEEEETET	NFPEPPQDQE	SSPIENDSSP			820
SEQ ID NO: 53		CCR4(KW_L2H) CAR - 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggg	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcgctgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420

[0278]

ggtggaggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagttctggc	gcgacctgg	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccttgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccagg	aaccttggc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcccgcac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgctgcgc	agccctgtgc	cctgcgcca	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaca	agagacgtgg	cgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaa	1320
cctcagggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcgaggcg	ctacagtga	1380
attgggatga	aaggcgagcg	cgggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503
SEQ ID NO: 54		CCR4(KW_L2H) CAR – 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDF	SGSGSGTDF	LKISRVEAED	VGVIYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDNA	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWQGTIV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPPRH	M				501
SEQ ID NO: 55		P2A – 核苷酸				
ggaagcggag	ctactaactt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaaccct	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 56		P2A – 氨基酸				
GSGATNFSLL		KQAGDVEENP GP				22
SEQ ID NO: 57		CD20 – 核苷酸				
atgacaacac	ccagaaattc	agtaaatggg	actttcccg	cagagccaat	gaaaggccct	60
attgctatgc	aatctgttcc	aaaaccactc	ttcaggagga	tgtcttcaact	ggtgggcccc	120
acgcaatcct	tcttcatgag	ggaatctaag	actttggggg	ctgtccagat	tatgaatggg	180
ctcttccaca	ttgccttggg	gggtcttctg	atgatcccag	cagggatcta	tgcacccatc	240
tgtgtgactg	tgtggtatcc	tctctgggga	ggcattatgt	atattatttc	cggatcactc	300
ctggcagcaa	cggagaaaaa	ctccaggaag	tgtttgttca	aaggaaaaat	gataatgaac	360
tcattgagcc	tctttgctgc	cattttctga	atgattcttt	caatcatgga	catacttaat	420
attaaaattt	cccatTTTTT	aaaaatggag	agtctgaatt	ttatttagagc	tcacacacca	480
tataattaaca	tatacaactg	tgaaccagct	aatccctctg	agaaaaactc	cccatctacc	540
caatactggt	acagcataca	atctctgttc	ttgggcattt	tgctcagtga	gctgatcttt	600
gccttcttcc	aggaaactgt	aatagctggc	atcgttgaga	atgaatggaa	aagaacgtgc	660
tccagaccca	aatctaacat	agttctcctg	tcagcagaag	aaaaaaaaga	acagactatt	720
gaaataaaaag	aagaagtgg	tgggctaact	gaaacatctt	cccaaccaa	gaatgaagaa	780
gacattgaaa	ttattccaat	ccaagaagag	gaagaagaag	aaacagagac	gaactttcca	840
gaacctcccc	aagatcagga	atcctcacca	atagaaaatg	acagctctcc	ttaa	894
SEQ ID NO: 58		CD20 – 氨基酸				
MTTPRNSVNG	TFPAEPMKGP	IAMQSGPKPL	FRMSSLVGP	TQSFFMRESK	TLGAVQIMNG	60
LFHIALGGLL	MIPAGIYAPI	CVTVWYPLWG	GIMYIISGSL	LAATEKNSRK	CLVKGKMIMN	120
SLSLFAAISG	MILSIMDILN	IKISHFLKME	SLNFIRAHTP	YINIYNCEPA	NPSEKNSPST	180
QYCYSIQSLF	LGILSVMLIF	AFFQELVIAG	IVENEWKRTC	SRPKSNIVLL	SAEEKKEQTI	240
EIKEEVVGLT	ETSSQPKNEE	DIEIIPQEE	EEEEETETNFP	EPPQDQESSP	IENDSSP	297
D. CCR4(KW_L2H)-FKBP-iCasp9 耗竭系统						
SEQ ID NO: 59		CCR4(KW_L2H)-FKBP-iCasp9 – 核苷酸				

[0279]

atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagea	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccgggtca	gcggcgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggagggt	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtcctggc	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccg	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccttggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgcag	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcctcgc	agcccctgtc	agcccgcca	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcagggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtga	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagaac	1560
cctggacctg	gagtgcagggt	ggagactatc	tccccaggag	acgggcgcac	cttccccaa	1620
cgcgccagca	cctgcgtggt	gcactacacc	gggatgcttg	aagatggaaa	gaaagttgat	1680
tcctcccggg	acagaaacaa	gccctttaag	tttatgctag	gcaagcagga	ggtgatccga	1740
ggctgggaag	aaggggttgc	ccagatgagt	gtgggtcaga	gagccaaact	gactatatct	1800
ccagattatg	cctatggtgc	cactgggcac	ccaggcatca	tcccaccaca	tgccactctc	1860
gtcttcgatg	tggagcttct	aaaactggaa	tctggcggtg	gctccggatt	tgggtgatgtc	1920
ggtgctcttg	agagtttgag	gggaaatgca	gatttggctt	acatcctgag	catggagccc	1980
tgtggccact	gcctcattat	caacaatgtg	aacttctgcc	gtgagtcagg	gctccgcacc	2040
cgactgggtc	ccaacatcga	ctgtgagaag	ttgcggcgctc	gcttctcctc	gctgcatttc	2100
atggttcggag	tgaaggcgca	cctgactgcc	aagaaaaatg	tgctggcttt	gctggatccg	2160
gcgcggcagg	accacggtgc	tctggactgc	tgctgtgtgg	tcattctctc	tcacggctgt	2220
caggccagcc	acctgcagtt	cccaggggct	gtctacggca	cagatggatg	ccctgtgtcg	2280
gtcgagaaga	ttgtgaacat	cttcaatggg	accagctgcc	ccagcctggg	agggaagccc	2340
aagctctttt	tcattccaggc	ctgtgtgtgg	gagcagaaag	accatgggtt	tgaggtggcc	2400
tccacttccc	ctgaagacga	gtcccctggc	agtaaccccg	agccagatgc	caccccgttc	2460
caggaagggt	tgaggacctt	cgaccagctg	gacgccatat	ctagtttgcc	cacaccaggt	2520
gacatctttg	tgtcctactc	tactttccca	ggttttggtt	cctggaggga	ccccaaaggt	2580
ggctcctggt	acgttgagac	cctggacgac	atctttgagc	agtgggctca	ctctgaagac	2640
ctgcagtcct	tcctgcttag	ggtcgctaat	gctgtttcgg	tgaaagggat	ttataaacag	2700
atgcctgggt	gctttaattt	cctccggaaa	aaacttttct	ttaaaacatc	ataa	2754
SEQ ID NO: 60		CCR4(KW L2H)-FKBP-iCasp9 - 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTGPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCYFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSRLRSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDNA	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWQGTLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPRH	MGSGATNFSL	LKQAGDVEEN	PGPGVQVETI	SPGDGRFTPK	540
RGQTCVVHYT	GMLDGKKVD	SSRDRNKPFK	FMLGKQEVIR	GWEEGVAQMS	VGQRAKLTI	600
PDYAYGATGH	PGIIPPHATL	VFDVELLKLE	SGGSGFGDV	GALESRLRGA	DLAYILSMEP	660
CGHCLIIINV	NFCRESGLRT	RTGSNIDCEK	LRRRFSSLHF	MVEVKGDLTA	KKMVLALLEL	720

[0280]

ARQDHGALDC	CVVILSHGC	QASHLQFPGA	VYGTGDCPVS	VEKIVNIFNG	TSCPSLGGKP	780
KLFFIQACGG	EQKDHGFEVA	STSPEDESPG	SNPEPDATPF	QEGLRTFDQL	DAISSLPPTS	840
DIFVSYSTFP	GFVSWRDPKS	GSWYVETLDD	IFEQWAHSED	LQSLLLRVAN	AVSVKGIYKQ	900
MPGCFNFLRK	KLFFKTS					917
SEQ ID NO: 61		CCR4(KW_L2H) CAR – 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtgggctgtg	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggaggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtcctggc	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccccctg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgcagc	acctacagct	actacccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	cgacttcacc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgctgc	agccccctgt	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cctggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcaactggt	1020
ataccctttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tcagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgagca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503
SEQ ID NO: 62		CCR4(KW_L2H) CAR – 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGGSGGGGS	GGGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWQGTLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPFRH	M				501
SEQ ID NO: 63		P2A – 核苷酸				
ggaagcggag	ctactaactt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaaccct	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 64		P2A – 氨基酸				
GSATNFSL	LKQAGDVEENP	GP				22
SEQ ID NO: 65		FKBP-iCasp9 – 核苷酸				
ggagtgcagg	tggagactat	ctccccagga	gacgggcgca	ccttcccca	gcgcggccag	60
acctgcgtgg	tgactacac	cgggatgctt	gaagatggaa	agaaagtga	ttcctcccg	120
gacagaaaca	agcccttta	gtttatgcta	ggcaagcagg	aggtgatccg	aggtgggaa	180
gaaggggttg	cccagatgag	tgtgggtcag	agagccaaac	tgactatata	tccagattat	240
gcctatgggt	ccactgggca	cccaggcatc	atcccaccac	atgccactct	cgtcttcgat	300
gtggagcttc	taaaactgga	atctggcggg	ggctccggat	ttggtgatgt	cggtgctctt	360
gagagtttga	ggggaaatgc	agatttggct	tacatcctga	gcatggagcc	ctgtggccac	420
tgctcatta	tcaacaatgt	gaacttctgc	cgtgagtcgg	ggctccgcac	ccgactggc	480
tccaaacatcg	actgtgagaa	gttgccggcg	cgcttctcct	cgctgcattt	catgggtggag	540
gtgaaggggc	acctgactgc	caagaaaatg	gtgctggctt	tgctggagct	ggcgcggcag	600
gaccacggtg	ctctggactg	ctgcgtgggtg	gtcattctct	ctcacggctg	tcaggccagc	660

cacctgcagt	tcccaggggc	tgtctacggc	acagatggat	gccctgtgtc	ggctcgagaag	720
atttgtgaaca	tcttcaatgg	gaccagctgc	cccagcctgg	gagggaaagcc	caagctcttt	780
ttcatccagg	cctgtggtgg	ggagcagaaa	gaccatgggt	ttgaggtggc	ctccacttcc	840
cctgaagacg	agtccccctg	cagtaacccc	gagccagatg	ccaccccgtt	ccaggaaggt	900
ttgaggacct	tcgaccagct	ggacgccata	tctagtttgc	ccacaccag	tgacatcttt	960
gtgtcctact	ctactttccc	aggttttgtt	tcctggaggg	accccaagag	tggtcctctg	1020
tacgttgaga	ccctggacga	catctttgag	cagtgggctc	actctgaaga	cctgcagtcc	1080
ctcctgctta	gggtcgctaa	tgctgtttcg	gtgaaaggga	tttataaaca	gatgcctggg	1140
tgctttaatt	tcctccggaa	aaaacttttc	tttaaaacat	cataa		1185
SEQ ID NO: 66 FKBP-iCasp9-氨基酸						
GVQVETISPG	DGRTFPKRQ	TCVVHYTGML	EDGKKVDSSR	DRNKPFFKML	GKQEVIRGWE	60
EGVAQMSVGQ	RAKLITISPDY	AYGATGHPGI	IPPHATLVFD	VELLKLESGG	GSFGDVGAL	120
ESLRGNADLA	YILSMPCGH	CLIIINNVNFC	RESGLRRTG	SNIDCEKLRR	RFSSLHFMVE	180
VKGDLTAKKM	VLALLELARQ	DHGALDCCVV	VILSHGCQAS	HLQFPGAVYG	TDGCPVSVEK	240
IVNIFNGTSC	PSLGGKPKLF	FIQACGGEQK	DHGFVASTS	PEDESPGSNP	EPDATPFQEG	300
LRTFDQLDAI	SSLPTPSDIF	VSYSTFPGFV	SWRDKPSGSW	YVETLDDIFE	QWAHSEDLQS	360
LLLRVANAVS	VKGIYQMPG	CFNFLRKKLF	FKTS			394
E. CCR4(KW_L2H)-单纯疱疹病毒-1 胸苷激酶 (HSVTK) 耗竭系统						
SEQ ID NO: 67 CCR4(KW_L2H)-HSVTK-核苷酸						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgtctgtg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatgg	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcgccgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtgg	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgtgcctt	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtgaaa	tcaagggaac	aggtggatca	420
gggtgaggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgccggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccgcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttgctatt	ggggccagg	aacctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgaccca	840
gcgcgcgcac	caccaacacc	ggcgccacc	atcgctcgc	agcccctgtc	cctgcgcca	900
gagcggtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctggcgcc	cttgccggg	acttgtggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaattctag	gacgaagaga	ggagtgcgat	1260
gttttgga	agagacgtgg	ccgggacct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtga	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggagggg	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgcgga	1500
agcggagcta	ctaacttcag	cctgtgaa	caggctggag	acgtggagga	gaaccctgga	1560
cctatggctt	cgtaccctcg	ccatcaaac	gcgtctgcgt	tcgaccaggc	tgccgcttct	1620
cgcgccata	gcaaccgacg	tacggcgttg	cgccctcgcc	ggcagcaaga	agccacggaa	1680
gtccgcctgg	agcagaaaat	gcccacgcta	ctgcgggttt	atatagacgg	tcctcacggg	1740
atggggaaaa	ccaccaccac	gcaactgctg	gtggccctgg	gttcgcgcga	cgatatcgtc	1800
tacgtaccog	agccgatgac	ttactggcag	gtgctggggg	cttcgcgagac	aatcgcgaa	1860
atctacacca	cacaacaccg	cctcgaccag	ggcgagatat	cgcccgggga	cgccggcgtg	1920
gtaatgacaa	gcgccagat	aacaatggg	atgccttatg	ccgtgaccga	cgccgttctg	1980
gtcctcatg	tcggggggga	ggctgggagt	tcacatgcc	cgcccccg	cctcaccctc	2040
atcttcgacc	gccatcccat	cgccgcctc	ctgtgtacc	cgcccgcg	ataccttatg	2100
ggcagcatga	ccccccaggc	cgtgtggcg	ttcgtggccc	tcaccccgcc	gaccttgccc	2160
ggcacaacaa	tcgtgttggg	ggcccttcg	gaggacagac	acatcgaccg	cctggccaaa	2220
cgccagcgcc	ccggcgagcg	gcttgacctg	gctatgctgg	ccgcgattcg	ccgcgtttac	2280
gggctgcttg	ccaatacgg	gcggtatctg	caggcgcgcg	ggctggttg	ggaggattgg	2340

[0281]

[0282]

ggacagcttt	cggggacggc	cgtgccgccc	caggggtgccg	agccccagag	caacgcgggc	2400
ccacgacccc	atatcgggga	cacgttat	accctgtttc	gggccccga	ggtgctggcc	2460
cccaacggcg	acctgtataa	cgtgtttgcc	tgggccttgg	acgtcttggc	caaacgcctc	2520
cgtcccatgc	acgtctttat	cctggattac	gaccaatcgc	ccgccggctg	ccgggacgcc	2580
ctgctgcaac	ttacctccgg	gatgggtccag	acccacgtca	ccaccccagg	ctccataccg	2640
acgatctgcg	acctggcgcg	cacgtttgcc	cgggagatgg	gggaggctaa	ctaa	2694
SEQ ID NO: 68		CCR4(KW_L2H)-HSVTK - 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGVIYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPRG	SGATNFSLLK	QAGDVEENPG	PMASYPCHQH	ASAFDQAARS	540
RGHSNRRTAL	RPRRQOEATE	VRLEQKMPTL	LRVYIDGPHG	MGKTTTTQLL	VALGSRDDIV	600
YVPEPMTYWQ	VLGASETIAN	IYTTQHRDLQ	GEISAGDAAV	VMTSAQITMG	MPYAVTDAVL	660
APHVGGGAGS	SHAPPPALTL	IFDRHPAIAL	LCYPAARYLM	GSMTQPQAVLA	FVALIPTLP	720
GTNIVLGALP	EDRHIDRLAK	RQRPGERLDL	AMLAAIRRVY	GLLANTVRYL	QGGGSGWEDW	780
GQLSGTAVPP	QGAEPQSNAG	PRPHIGDTLF	TLFRAPELLA	PNGDLYNVFA	WALDVLAKRL	840
RPMHVFILDY	DQSPAGCRDA	LLQLTSGMVQ	THVTTGPSIP	TICDLARTFA	REMGEAN	897
SEQ ID NO: 69		CCR4(KW_L2H) CAR - 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgag	gacagaagt	tcagctggtt	480
gagtcctggcg	gcgacctggg	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccg	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggtctatt	ggggccaggg	aacctgggtc	accgtttcta	gttcgggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgcag	caccaacacc	ggcgccacc	atcgctgcg	agccctgtc	cctgcgccca	900
gaggctggcc	ggcagcgcg	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	tgccgctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cctggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgagca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503
SEQ ID NO: 70		CCR4(KW_L2H) CAR - 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGVIYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGLV	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPRH	M				501

[0283]

SEQ ID NO: 71	P2A – 核苷酸	
ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct		60
ggacct		66
SEQ ID NO: 72	P2A – 氨基酸	
GS GATNFSLL KQAGDVEENP GP		22
SEQ ID NO: 73	HSVTK – 核苷酸	
atggcttcgt acccctgcca tcaacacgag tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc		60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctgcgccgc agcaagaagc cacggaagtc		120
cgcttgagag agaaaatgcc cagcctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg		180
gggaaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac		240
gtacccgagc cgtgactta ctggcagggt ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc		300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggc gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta		360
atgacaagcg ccagataac aatgggcatg ccttatgccc tgaccgacgc cgttctggct		420
cctcatgtcg ggggggagge tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc		480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccggc ccgcgcgata ccttatgggc		540
agcatgaccc ccagggcgt gctggcgttc gtggccctca tcccgcgcac cttgcccggc		600
acaaacatcg tgttgggggc ccttcggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc		660
cagcgcccg gcgagcggt tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg		720
ctgcttgcca atacgtgag gtatctgcag ggcggcggt cgtggtggga ggattggga		780
cagctttcgg ggacggcgt gccgcccag ggtgccgag ccagagcaa cgcggccca		840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg ccccgagtt gctggcccc		900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgccctg gccttggacg tcttggccaa acgcctcgt		960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg ccggtgccc ggacgccctg		1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cagctacca cccaggtc cataccgacg		1080
atcgcgacc tggcgcgac gtttgcccg gagatggggg aggctaacta a		1131
SEQ ID NO: 74	HSVTK – 氨基酸	
MASYPCHQHA SA FDQAARS R GHSNRRTALR PRRQQEATEV RLEQKMPTLL RVIYIDGPHGM		60
GKTTTTQLLV ALGSRDDIVY VPEPMYQV LGASETIANI YTTQHRLDQG EISAGDAAVV		120
MTSAQITMG M PYAVTDAVLA PHVGGEAGSS HAPPPALTLI FDRHPAIAL CYP AARYLMG		180
SMT PQAVLAF VALI PPTLP G TNIVL GALPE DRHIDRLAKR QRPGERL DLA MLAAIRRVYG		240
LLANTVRYLQ GGSWWEDWG QLSGTAVPPQ GAEPQSNAGP RPHIGDTLFT LFRAPPELLAP		300
NGDLYNVFAW ALDVLAKRLR PMHVFILDYD QSPAGCRDAL LQLTSGMVQT HVTTPGSIPT		360
ICDLARTFAR EMGEAN		376
F. dnTGFRII-CCR4(KW_L2H)-HSVTK (最高 (top)) 耗竭系统		
SEQ ID NO: 75	dnTGFRII-CCR4(KW_L2H)-HSVTK – 核苷酸	
atgggtcggg ggctgctcag gggcctgtgg ccgctgcaca tcgtcctgtg gacgcgtatc		60
gccagcacga tcccaccgca cgttcagaag tcggatgtgg aaatggaggc ccagaaagat		120
gaaatcatct gccccagctg taataggact gccatccac tgagacatat taataacgac		180
atgatagtea ctgacaacaa cgggtgcagtc aagtttccac aactgtgtaa attttgtgat		240
gtgagatttt ccacctgtga caaccagaaa tctgtcatga gcaactgcag catcacctcc		300
atctgtgaga agccacagga agtctgtgtg gctgtatgga gaaagaatga cgagaacata		360
acactagaga cagtttgcca tgaccccaag ctccctacc atgactttat tctggaagat		420
gctgcttctc caaagtgcac tatgaaggaa aaaaaaaagc ctggtgagac tttcttcacg		480
tgttcctgta gctctgatga gtgcaatgac aacatcatct tctcagaaga atataacacc		540
agcaatcctg acttgttget agtcataatt caagtgcagc gcatcagcct cctgccacca		600
ctgggagttg ccatactgt catcatcatc ttctactgct accgcgttaa ccggcagcag		660
aagctgggca gcggcgaggg cagaggcagc ctgctgacct gcggcgacgt ggaggagaac		720
cccgaccta tggccctgcc tgtgacagcc ctgctgctgc ctctggctct gctgctgcat		780
gccgtagac ccggtaccga cgtgctgatg acacagagcc ctctgagcct gcctgtgaca		840
cctggcgaac ctgccagcat cagctgcaga tccagccgga acatcgtgca catcaacggc		900
gacacctacc tggaaatgta tctgcagaag cccggccagt ctctcagct gctgatctac		960
aaggtgtcca accggttcag cggcgtgcc gatagatttt ctggcagcgg ctctggcacc		1020
gacttaccoc tgaagatctc cagagtggaa gccgaggacg tgggcgtgta ctactgcttc		1080
caaggctctc tgcctccctg gacatttggc cagggcacca aggtggaaat caaggaggga		1140
ggtggatcag gtggagggtg aagcggggga ggaggttccg gcggcgagg atcagaagtt		1200
cagctggttg agtctggcgg cgacctggtt cagcctggca gatctctgag actgagctgt		1260
gccgccagcg gcttcattct cagcaactac ggcctgagct ggggtccgaca ggccccgga		1320
aaaggactgg aatgggtcgc cacaatcagc agcgcacgca cctacagcta ctaccccgat		1380

[0284]

agcgtgaagg	gcagattcac	catcagccgg	gacaacgcca	agaacagcct	gtacctgcag	1440
atgaaactccc	tgcgcgtgga	agatacagcc	ctgtactatt	gcggcagaca	cagcgacggc	1500
aacttcgcct	ttggctattg	gggccaggga	accctggcca	cggtttctag	ttccggaacc	1560
acgacgccag	cgccgcgacc	accaacaccg	gcgcccacca	tcgcgtcgca	gcccctgtcc	1620
ctgcgccag	aggcgtgccg	gccagcgccg	gggggcgcag	tgacacagag	ggggctggac	1680
ttcgctgtg	atatctacat	ctgggcgccc	ttggccggga	cttgtggggg	ccttctcctg	1740
tcactgggta	tcaccttta	ctgcaaacgg	ggcagaaaga	aactcctgta	tatattcaaa	1800
caaccattta	tgagaccagt	acaaactact	caagagggaag	atggctgtag	ctgccgattt	1860
ccagaagaag	aagaaggagg	atgtgaactg	agagtgaagt	tcagcaggag	cgacagacc	1920
ccgcgtaca	agcagggcca	gaaccagctc	tataacgagc	tcaatctagg	acgaagagag	1980
gagtacgatg	ttttggacaa	gagacgtggc	cgggaccctg	agatgggggg	aaagccgaga	2040
aggaagaacc	ctcagggaag	cctgtacaat	gaactgcaga	aagataagat	ggcggaggcc	2100
tacagtgaga	ttgggatgaa	aggcgagcgc	cggaggggca	aggggcacga	tggcctttac	2160
cagggctcga	gtacagccac	caaggacacc	tacgacgccc	ttcacatgca	ggccctgccc	2220
cctcgcgga	gcggagctac	taacttcagc	ctgctgaagc	aggctggaga	cgtggaggag	2280
aaccttgga	ctatggcttc	gtacctcctg	catcaaacag	cgtctgcgtt	cgacagcgt	2340
gcgcgttctc	gcggccatag	caaccgacgt	acggcgttgc	gcccctgccc	gcagcaagaa	2400
gccacggaag	tccgcctgga	gcagaaaatg	cccacgctac	tgccgggtta	tatagacggt	2460
cctcacggga	tggggaaaac	caccaccacg	caactgctgg	tggccctggg	ttcgcgcgac	2520
gatatcgctc	acgtaccgga	gccgatgact	tactggcagg	tgctgggggc	ttccgagaca	2580
atcggaaca	tctacaccac	acaacaccgc	ctcgaccagg	gcgagataac	ggccggggag	2640
gcggcggtgg	taatgacaag	cgccagata	acaattggca	tgcccttatg	cgtgaccgac	2700
gccgttctgg	ctcctcatgt	cgggggggag	gctggggggt	cacatgcccc	gccccggcc	2760
ctcaccctca	tcttcgaccg	ccatcccatc	gcgcgccctc	tgtgctaccc	ggccgcgcga	2820
taccttatgg	gcagcatgac	ccccaggcc	gtgctggcgt	tcgtggccct	catcccgccg	2880
acettgcccc	gcacaaacat	cgtgttgggg	gcccttcctg	aggacagaca	catcgaccgc	2940
ctggccaaac	gccagcgccc	cggcgagcgg	cttgacctgg	ctatgctggc	cgcgattcgc	3000
cgcgtttaag	ggctgcttgc	caatacgggt	cggtatctgc	agggcgggcg	gtcgtggtgg	3060
gaggattggg	gacagcttcc	ggggacggcc	gtgcgcgcc	aggggtgccga	gccccagagc	3120
aacgcggggc	cacgacccca	tatcggggac	acgttatatta	ccctgtttcg	ggcccccgag	3180
ttgctggccc	ccaacggcga	cctgtataac	gtgtttgcct	gggccttgga	cgtcttgggc	3240
aaacgcctcc	gtcccatgca	cgtctttatc	ctggattacg	accaatcgcc	cgccggctgc	3300
cgggacggcc	tgctgcaact	tacctccggg	atggtccaga	cccacgtcac	caccccaggc	3360
tccataaccga	cgatctgcga	cctggcgcg	acgtttgccc	gggagatggg	ggaggctaac	3420
taa						3423
SEQ ID NO: 76		dnTGFRII-CCR4(KW_L2H)-HSVTK - 氨基酸				
MGRGLRGLW	PLHIVLWTRI	ASTIPPHVQK	SDVEMEAQKD	EIICPSCNRT	AHPLRHINND	60
MIVTDNNGAV	KFPQLCKFCD	VRFSTCDNQK	SCMSNCSITS	ICEKPQEVCV	AVWRKNDENI	120
TLETVCHDPK	LPYHDFILED	AASPKCIMKE	KKKPGETFFM	CSCSSDECND	NIIFSEEYNT	180
SNPDLLLIVF	QVTGISLLPP	LGVAISVII	FYCYRVNRQQ	KLGSGEGRGS	LLTCGDVEEN	240
PGPMALPVTA	LLLPLALLLH	AARPGSDVLM	TQSPLSLPVT	PGEPAISICR	SSRNIVHING	300
DTYLEWYLQK	PGQSPQLLIY	KVSNRFSGVF	DRFSGSGSGT	DFTLKISRVE	AEDVGVIYCF	360
QGSLLPWTFG	QGTKEVEIKG	GGSGGGGSGG	GGSGGGGSEV	QLVESGGDLV	QPGRLRLSC	420
AASGFIFSNY	GMSWVRQAPG	KGLEWVATIS	SASTYSYYPD	SVKGRFTISR	DNAKNSLYLQ	480
MNSLRVEDTA	LYYCGRHSDG	NFAFGYWQGG	TLVTVSSSGT	TTPAPRPPTP	APTIASQPLS	540
LRPEACRPAA	GGAVHTRGLD	FACDIYIWAP	LAGTCGVLLL	SLVITLYCKR	GRKKLLYIFK	600
QPFMRPVQTT	QEEDGCSCRF	PEEEEGGCEL	RVKFSRSADA	PAYKQGQNQL	YNELNLGRRE	660
EYDVLDKRRG	RDPEMGGKPR	RKNPQEGLYN	ELQKDKMAEA	YSEIGMKGER	RRGKGHDGLY	720
QGLSTATKDT	YDALHMQALP	PRGSGATNFS	LLKQAGDVEE	NPGPMASYP	HQHASAFDQA	780
ARSRGHSNRR	TALRPRRQGE	ATEVRLEQKM	PTLLRVYIDG	PHGMGKTTT	QLLVALGSRD	840
DIVYVPEPMT	YWQVLGASET	IANIYTTQHR	LDQGEISAGD	AAVMTSAQI	TMGMPYAVTD	900
AVLAPHVGE	AGSSHAPPPA	LTLIFDRHPI	AALLCYPAAR	YLMGSMTPQA	VLAFLVALIPP	960
TLPGTNIVLG	ALPEDRHIDR	LAKRQRPGER	LDLAMLAAIR	RVYGLLANTV	RYLQGGGSWW	1020
EDWGQLSGTA	VPPQGAEPQS	NAGPRPHIGD	TLFTLFRAPE	LLAPNGDLYN	VFAWALDVLA	1080
KRLRPMHVFI	LDYDQSPAGC	RDALLQLTSG	MVQTHVTPFG	SIPTICDLAR	TFAREMGEAN	1140
SEQ ID NO: 77		dnTGNbRII - 核苷酸				
atgggtcggg	ggctgctcag	gggcctgtgg	cgctgcaca	tcgtcctgtg	gacgcgtatc	60
gccagcacga	tcccaccgca	cgttcagaag	tcggatgtgg	aatggaggc	ccagaaagat	120
gaaatcatct	gccccagctg	taataggact	gccccccac	tgagacatat	taataacgac	180

[0285]

atgatagtca	ctgacaacaa	cgggtgcagtc	aagttttccac	aactgtgtaa	atthttgtgat	240
gtgagattht	ccacctgtga	caaccagaaa	tcctgcatga	gcaactgcag	catcacctcc	300
atctgtgaga	agccacagga	agtctgtgtg	gctgtatgga	gaaagaatga	cgagaacata	360
acactagaga	cagtttgcca	tgaccccaag	ctccctacc	atgactttat	tctggaagat	420
gctgcttctc	caaagtgcac	tatgaaggaa	aaaaaaaaagc	ctggtgagac	tttcttcatg	480
tgttcctgta	gctctgatga	gtgcaatgac	aacatcatct	tctcagaaga	atataacacc	540
agcaatcctg	acttgttget	agtcataatt	caagtgcacg	gcacagcct	cctgccacca	600
ctgggagttg	ccatactctg	catcatcacc	ttctactgct	accgcgttaa	cgggcagcag	660
aagctg						666
SEQ ID NO: 78		dnTGNbRII – 氨基酸				
MGRGLLRGLW	PLHIVLWTRI	ASTIPPHVQK	SDVEMEAQKD	EIICPSCNRT	AHPLRHINND	60
MIVTDNNGAV	KFPQLCKFCD	VRFTCDNQK	SCMSNCSITS	ICEKPQEVCV	AVWRKNDENI	120
TLETVCHDPK	LPYHDFILED	AASPKCIMKE	KKKPGETFFM	CSCSSDECND	NIIFSEEYNT	180
SNPDLLLVI	QVTGISLLPP	LGVAISVIII	FYCYRVNRQQ	KL		222
SEQ ID NO: 79		T2A – 核苷酸				
ggcagcggcg	agggcagagg	cagcctgctg	acctgcggcg	acgtggagga	gaaccccgga	60
cct						63
SEQ ID NO: 80		T2A – 氨基酸				
GSGEGRGSL	TCGDVEENPG	P				21
SEQ ID NO: 81		CCR4(KW_L2H) CAR – 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggg	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcgccgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggggcgtg	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggaggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgccggag	gatcagaagt	tcagctgggt	480
gagtcctggc	gcgacctggg	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cgcatgagc	tgggtccgac	aggccctctg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctgggc	accgtttcta	gttccggaac	cagcagccca	840
gcccgcggac	caccaacacc	ggcgccacc	atcgctgcgc	agccctctgc	cctgcgccc	900
gagggcgtgc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatactctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactgggt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcccagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgagaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcgagggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgc	1497
SEQ ID NO: 82		CCR4(KW_L2H) CAR – 氨基酸				
MALPVTALL	PLALLHAAR	PGSDVLTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPG	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDR	SGSGSGTDF	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQT	KVEIKGGGS	GGGSGGGGS	GGGSEVQLV	ESGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGM	WVRQAPGKL	EWVATISSAS	TYSYYPDSV	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALY	CGRHSDGNF	FGYWGQGLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAP	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGG	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLSLV	ITLYCKRGR	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQE	DGCSCRFPE	EEGGCELRVK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRD	EMGGKPRRK	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYD	LHMQUALPP					499
SEQ ID NO: 83		P2A – 核苷酸				
ggaagcggag	ctactaactt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaaccct	60
ggacct						66

[0286]

SEQ ID NO: 84		P2A – 氨基酸				
GSGATNFSLL KQAGDVEENP GP		22				
SEQ ID NO: 85		HSVTK – 核苷酸				
atggcttcgt	acccctgcc	tcaacacgcg	tctgcgttcg	accaggetgc	gcgttctcgc	60
ggccatagca	accgacgtac	ggcgttgcgc	cctcgccggc	agcaagaagc	cacggaagtc	120
cgcttgagc	agaaaatgcc	cacgctactg	cgggtttata	tagacggtcc	tcacgggatg	180
gggaaaacca	ccaccacgca	actgctggtg	gccctgggtt	cgcgcgacga	tatcgtctac	240
gtacccgagc	cgatgactta	ctggcaggtg	ctgggggctt	ccgagacaat	cgcgaacatc	300
tacaccacac	aacaccgcct	cgaccagggc	gagatatcgg	cgggggacgc	ggcggtggtta	360
atgacaagcg	cccagataac	aatgggcatg	ccttatgcgg	tgaccgacgc	cgttctggtc	420
cctcatgtcg	ggggggaggc	tgggagttca	catgccccgc	ccccggccct	caccctcatc	480
ttcgaccgcc	atcccatcgc	cgccctcctg	tgctaccggc	ccgcgcgata	ccttatgggc	540
agcatgaccc	cccaggccgt	gctggcggtc	gtggccctca	tcccgcgcgac	cttgcccggc	600
acaaacatcg	tggtgggggc	ccttcgggag	gacagacaca	tcgaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgcccg	gcgagcggct	tgacctggct	atgctggcgg	cgattcgccg	cgtttacggg	720
ctgcttgcca	atacggtgcg	gtatctgcag	ggcggcggggt	cgtggtggga	ggattgggga	780
cagctttcgg	ggacggcgtg	gccgcccag	ggtgcgcgagc	cccagagcaa	cgcggggcca	840
cgaccccata	tcggggacac	gttatttacc	ctgttctggg	cccccgagtt	gctggcccc	900
aacggcgacc	tgtataacgt	gtttgcctgg	gccttggacg	tcttggccaa	acgcctccgt	960
cccatgcacg	tctttatcct	ggattacgac	caatcgccg	ccggtcgccg	ggacgccttg	1020
ctgcaactta	cctccgggat	ggtccagacc	cacgtacca	cccagggctc	cataccgacg	1080
atctgcgacc	tggcgcgcac	gtttgcccg	gagatggggg	aggctaacta	a	1131
SEQ ID NO: 86		HSVTK – 氨基酸				
MASYPCHQHA	SAFDQAARSR	GHSNRRTALR	PRRQQEATEV	RLEQKMPTLL	RVIYIDGPHGM	60
GKTTTTQLLV	ALGSRDDIVY	VPEPMYQV	LGASETIANI	YTTQHRLDQG	EISAGDAAVV	120
MTSAQITMGM	PYAVTDAVLA	PHVGGEAGSS	HAPPPALTLI	FDRHPIAALL	CYPARYLMG	180
SMTPOAVLAF	VALIPPTLPG	TNIVLGALPE	DRHIDRLAKR	QRPGERLALA	MLAAIRRVYG	240
LLANTVRYLQ	GGGSWWEDWG	QLSGTAVPPQ	GAEPQSNAGP	RPHIGDTLFT	LFRAPPELLAP	300
NGDLNVFAW	ALDVLAKRLR	PMHVFILDYD	QSPAGCRDAL	LQLTSGMVQT	HVTTPGSIPT	360
ICDLARTFAR	EMGEAN					376
G. CCR4(KW_L2H)-dnTGFbRII-HSVTK (中间 (mid)) 耗竭系统						
SEQ ID NO: 87		CCR4(KW_L2H)-dnTGFbRII-HSVTK – 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatctgic	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccgccag	tctctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccgggtca	gcgcgctgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtgga	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aagggtgaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggagggt	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgagg	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcactc	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	agggccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccgga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccgcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aacctgggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgac	caccaacacc	ggcgcgccacc	atcgctcgc	agccctgtc	cctgcgcca	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctata	tctgggcgcc	ccttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcaccttcc	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaacctatt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgcgcat	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtga	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	agggcctgcc	ccctgcgga	1500
agcggagcta	ctaacttcag	cctgctgaag	caggctggag	acgtggagga	gaaccttgga	1560

[0287]

cctatgggtc	gggggctgct	caggggcctg	tggccgctgc	acatcgctcct	gtggacgcgt	1620
atcgccagca	cgatcccacc	gcacgttcag	aagtcggatg	tggaaatgga	ggcccagaaa	1680
gatgaaatca	tctgccccag	ctgtaatagg	actgcccata	cactgagaca	tattaataaac	1740
gacatgatag	tcactgacaa	caacggtgca	gtcaagtttc	cacaactgtg	taaattttgt	1800
gatgtgagat	tttccacctg	tgacaaccag	aaatcctgca	tgagcaactg	cagcatcacc	1860
tccatctgtg	agaagccaca	ggaagtctgt	gtggctgtat	ggagaaagaa	tgacgagaac	1920
ataacactag	agacagtttg	ccatgacccc	aagctcccct	accatgactt	tattctggaa	1980
gatgtgctt	ctccaaagtg	cattatgaag	gaaaaaaaaa	agcctgggtg	gactttcttc	2040
atgtgttcct	gtagctctga	tgagtgcatt	gacaacatca	tcttctcaga	agaatataac	2100
accagcaatc	ctgacttggt	gctagtcata	tttcaagtga	caggcatcag	cctcctgcca	2160
ccactgggag	ttgccatata	tgtcatcata	atcttctact	gctaccgcgt	taaccggcag	2220
cagaaactgg	gcagcggcga	gggcagaggc	agcctgctga	cctgcggcga	cgtggaggag	2280
aaccccgga	ctatggtctc	gtaccctgct	catcaacacg	cgtctgcgtt	cgaccaggct	2340
gcgcgttctc	gcggccatag	caaccgacgt	acggcggtgc	gccctcgccg	gcagcaagaa	2400
gccacggaag	tccgcctgga	gcagaaaatg	cccacgtcac	tgccgggtta	tatagacggt	2460
cctcacggga	tggggaaaac	caccaccacg	caactgctgg	tggccctggg	ttcgcgcgac	2520
gatatcgtct	acgtaccgga	gccgatgact	tactggcagg	tgtctggggc	ttccgagaca	2580
atcgcaaca	tctacaccac	acaacaccgc	ctcgaccagg	gcgagataat	ggccggggac	2640
gcgcggtgg	taatgacaag	cgcccagata	acaatgggca	tgcccttatgc	cgtgaccgac	2700
gcggttctgg	ctcctcatgt	cgggggggag	gctgggagtt	cacatgcccc	gcccccggcc	2760
ctcaccctca	tcttcgaccg	ccatcccatc	gccgcctccc	tgtgctaccc	ggccgcgcga	2820
taccttatgg	gcagcatgac	ccccagcgcc	gtgctggcgt	tcgtggccct	catcccgccg	2880
accttgcccg	gcacaaacat	cgtgttgggg	gcccttcggg	aggacagaca	catcgaccgc	2940
ctggccaaac	gccagcgccc	cggcgagcgg	cttgacctgg	ctatgctggc	cgcgattcgc	3000
cgcgtttacg	ggctgcttgc	caatacggtg	cggtatctgc	agggcggcgg	gtcgtggtgg	3060
gaggattggg	gacagctttc	ggggacggcc	gtgccgcccc	aggggtgccga	gccccagagc	3120
aacgcgggcc	cacgacccca	tatcggggac	acgttatatta	ccctgtttcg	ggcccccgag	3180
ttgctggccc	ccaacggcga	cctgtataac	gtgtttgcct	gggccttgga	cgtcttgggc	3240
aaacgcctcc	gtcccatgca	cgtctttatc	ctggattacg	accaatcgcc	cgccggctgc	3300
cgggacggcc	gtctgcaact	tacctccggg	atggtcacga	cccacgtcac	caccccgagg	3360
tccataaccga	cgatctgcga	cctggcgccg	acgtttgccc	gggagatggg	ggaggctaac	3420
taa						3423
SEQ ID NO: 88		CCR4(KW_L2H)-dnTGFbRII-HSVTK - 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTGGE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCYFQGS	120
LLPWFQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSGEVQLV	ESGGDLVQPG	RSRLRSCAAS	180
GFIIFSNGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWQGTLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELRVK	FERSADAPAY	KQQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPRG	SGATNFSLLK	QAGDVEENPG	PMGRGLLRGL	WPLHIVLWTR	540
IASTIPPHVQ	KSDVEMEAQK	DEIICPSCNR	TAHPLRHINN	DMIVTDNNGA	VKFPQLCKFC	600
DVRFSTCDNQ	KSCMSNCSIT	SICEKPQEV	VAVWRKNDEN	ITLETVCHDP	KLPYHDFILE	660
DAASPKCIMK	EKKKPGETFF	MCSCSSDECN	DNIIIFSEEYN	TSNPDLLLVI	FQVTGISLLP	720
PLGVAISVII	IFYCYRVNRQ	QKLGSGEGRG	SLLTCGDVEE	NPGPMASYPC	HQHASAFDQA	780
ARSRGHSNRR	TALRPRRQOE	ATEVRLEQKM	PTLLRVYIDG	PHGMGKTTT	QLLVALGSRD	840
DIVYVPEPMT	YWQVLGASET	IANIYTTQHR	LDQGEISAGD	AAVVM TSAQI	TMGMPYAVTD	900
AVLAPHVGG	AGSSHAPPPA	LTLIFDRHPI	AALLCYP AAR	YLMGSMTPQA	VLA FVALIPP	960
TLPGTNIVLG	ALPEDRHIDR	LAKRQRPGER	LDLAMLAAIR	RVYGLLANTV	RYLQGGGSWW	1020
EDWGQLSGTA	VPPQGAEPQS	NAGPRPHIGD	TLFTLFRAPE	LLAPNGDLYN	VFAWALDVLA	1080
KRLRPMHVEI	LDYDQSPAGC	RDALLQLTSG	MVQTHVTPG	SIPTICDLAR	TFAREMGEAN	1140
SEQ ID NO: 89		CCR4(KW_L2H) CAR - 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgtctgctgca	tgcgcctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgcctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgctg	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgtctgacta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcggtgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtgga	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360

[0288]

ctgctgacct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgagg	gatcagaagt	tcagctgggt	480
gagtcctggcg	gcgacctggg	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagc	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctgggc	accgtttcta	gttccggaac	cacgaccca	840
gcgcgcgcgac	caccaacacc	ggcgccacc	atcgcgctgc	agcccctgtc	cctgcgccca	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactgggt	1020
atcaccccttt	actgcaaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgggaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtga	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgc	1497
SEQ ID NO: 90 CCR4(KW L2H) CAR – 氨基酸						
MALPVTALLL	PLALLHAAR	PGSDVLTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDF	SGSGSGTDF	LKISRVEAED	VGYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGS	GGGSGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWQGTIV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQLPPR					499
SEQ ID NO: 91 P2A – 核苷酸						
ggaagcggag	ctactaactt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaaccct	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 92 P2A – 氨基酸						
GSGATNFSLL KQAGDVEENP GP						22
SEQ ID NO: 93 dnTGFbRII – 核苷酸						
atgggtcggg	ggctgctcag	gggcctgtgg	cgcgtgcaca	tcgtcctgtg	gacgcgtatc	60
gccagcacga	tcccaccgca	cgttcagaag	tcggatgtgg	aaatggaggc	ccagaaagat	120
gaaatcatct	gccccagctg	taataggact	gccccatccac	tgagacatat	taataacgac	180
atgatagtea	ctgacaacaa	cgggtgcagtc	aagtttccac	aactgtgtaa	attttctgat	240
gtgagatttt	ccacctgtga	caaccagaaa	tctgtcatga	gcaactgcag	catcacctcc	300
atctgtgaga	agccacagga	agtctgtgtg	gctgtatgga	gaaagaatga	cgagaacata	360
acactagaga	cagtttgcca	tgaccccaag	ctcccctacc	atgactttat	tctggaagat	420
gctgcttctc	caaagtgcac	tatgaaggaa	aaaaaaaagc	ctggtgagac	tttcttcatg	480
tggtcctgta	gctctgatga	gtgcaatgac	aacatcatct	tctcagaaga	atataacacc	540
agcaatcctg	acttgttgct	agtcataatt	caagtgcagc	gcacagcctc	cctgccacca	600
ctgggagttg	ccatattctg	catcatcatc	ttctactgct	accgcgttaa	ccggcagcag	660
aagctg						666
SEQ ID NO: 94 dnTGFbRII – 氨基酸						
MGRGLLRGLW	PLHIVLWTRI	ASTIPPHVQK	SDVEMEAQKD	EIICPSCNRT	AHPLRHINND	60
MIVTDNNGAV	KFPQLCKFCD	VRFTCDNQK	SCMSNCSITS	ICEKPQEVCV	AVWRKNDENI	120
TLETVCHDPK	LPYHDFIED	AASPKCIMKE	KKKPGTEFFM	CSCSSDECND	NIIFSEEYNT	180
SNPDLLLVIF	QVTGISLLPP	LGVAISVIII	FYCYRVNRQQ	KL		222
SEQ ID NO: 95 T2A – 核苷酸						
ggcagcggcg	agggcagagg	cagcctgctg	acctgcggcg	acgtggagga	gaacccccga	60
cct						63
SEQ ID NO: 96 T2A – 氨基酸						
GSGEGRGSL TCGDVEENPG P						21
SEQ ID NO: 97 HSVTK – 核苷酸						

atggcttcgt	acccttgcca	tcaacacgcg	tctgcgttcg	accaggtgc	gcgttctcgc	60
ggccatagca	accgacgtac	ggcgttgcgc	cctcgccggc	agcaagaagc	cacggaagtc	120
cgcttgagc	agaaaatgcc	cacgctactg	cgggtttata	tagacggtcc	tcacgggatg	180
gggaaaacca	ccaccacgca	actgctggtg	gccctgggtt	cgcgcgacga	tatcgtctac	240
gtacccgagc	cgatgactta	ctggcaggtg	ctggggggtt	cagagacaat	cgcgaacatc	300
tacaccacac	aacaccgcct	cgaccagggc	gagatatcgg	cgggggacgc	ggcgggtgta	360
atgacaagcg	cccagataac	aatgggcatg	ccttatgccc	tgaccgacgc	cgttctggct	420
cctcatgtcg	ggggggaggc	tgggagttca	catgcccgc	ccccggccct	cacctcatc	480
ttcgaccgcc	atcccatcgc	cgcctcctg	tgctaccggc	cgcgcgata	ccttatgggc	540
agcatgaccc	cccagggcgt	gctggcggtc	gtggccctca	tcccgcgcac	cttgcccggc	600
acaaacatcg	tggtgggggc	ccttcggag	gacagacaca	tcgaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgcccg	gcgagcggt	tgacctggct	atgctggccg	cgattcgccg	cgtttacggg	720
ctgcttgcca	atacgttgcg	gtatctgcag	ggcggcggt	cgtggtggga	ggattgggga	780
cagctttcgg	ggacggccgt	gccgccccag	ggtgccgagc	cccagagcaa	cgcggggcca	840
cgaccccata	tcggggacac	gttatttacc	ctgtttcggg	ccccgagtt	gctggccccc	900
aacggcgacc	tgtataacgt	gtttgcctgg	gccttggacg	tcttggccaa	acgcctccgt	960
cccatgcacg	tctttatcct	ggattacgac	caatcgcccg	cgggtgccc	ggacgcctg	1020
ctgcaactta	cctccgggat	ggtccagacc	cacgtcacca	ccccaggtc	cataccgacg	1080
atctgcgacc	tggcgcgac	gtttgccgg	gagatggggg	aggctaacta	a	1131
SEQ ID NO: 98						
HSVTK - 氨基酸						
MASYPCHQHA	SAFDQAARSR	GHSNRRTALR	PRRQQEATEV	RLEQKMPTLL	RVYIDGPHGM	60
GKTTTTQLLV	ALGSRDDIVY	VPEPMYQWV	LGASSETIANI	YTTQHRLDQG	EISAGDAAVV	120
MTSAQITMGM	PYAVTDAVLA	PHVGGEAGSS	HAPPALTLI	FDRHPIALAL	CYPAARYLMG	180
SMTPQAVLAF	VALIPPTLPG	TNIVLGALPE	DRHIDRLAKR	QRPGERLDLA	MLAAIRRVYG	240
LLANTVRYLQ	GGGSWWEDWG	QLSGTAVPPQ	GAEPQSNAGP	RPHIGDTLFT	LFRAPPELLAP	300
NGDLYNVFAW	ALDVLAKRLR	PMHVFILDYD	QSPAGCRDAL	LQLTSGMVQT	HVTTPGSIPT	360
ICDLARTFAR	EMGEAN					376
H. CCR4(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFbRII (最末 (last)) 耗竭系统						
SEQ ID NO: 99						
CCR4(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFbRII - 核苷酸						
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctctcagc	tgctgatcta	caagggtctc	240
aaccggttca	gcggcgctgc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtgga	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggaggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcgag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcactc	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgag	aggccccctg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacgct	actaccccca	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggtattt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgctgctc	agccccctgt	cctgcgcccc	900
gaggcggtgc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgctgtt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cctggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaa	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgagca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcgagggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	cctcgcgga	1500
agcggagcta	ctaacttcag	cctgctgaag	caggctggag	acgtggagga	gaaccctgga	1560
cctatggctt	cgtacccctg	ccatcaacac	gcgtctgcgt	tcgaccaggc	tgcgcgttct	1620
cgcgcccata	gcaaccgacg	tacggcgttg	cgccctcgcc	ggcagcaaga	agccacggaa	1680
gtccgcctgg	agcagaaaat	gcccacgcta	ctgcggtttt	atatagacgg	tcctcacggg	1740
atggggaaaa	ccaccaccac	gcaactgctg	gtggccctgg	gttcgcgcga	cgatatcgtc	1800

[0289]

[0290]

tacgtaccgc	agccgatgac	ttactggcag	gtgctggggg	cttccgagac	aatcgcgaa	1860
atctacacca	cacaacaccg	cctcgaccag	ggcgagatat	cgcccgggga	cgccgcggtg	1920
gtaatgacaa	gcgcccagat	aacaatgggc	atgccttatg	ccgtgaccga	cgccgttctg	1980
gtcctcatg	tcggggggga	ggctgggagt	tcacatgccc	cgcccccgcc	cctcaccctc	2040
atcttcgacc	gccatcccat	cgccgcctc	ctgtgctacc	cgcccgcgcg	ataccttatg	2100
ggcagcatga	ccccccaggc	cgtgctggcg	ttcgtggccc	tcaccccgcc	gaccttgccc	2160
ggcacaaaca	tcgtgttggg	ggcccttcgg	gaggacagac	acatcgaccg	cctggccaaa	2220
cgccagcgcc	ccggcgagcg	gcttgacctg	gctatgctgg	ccgcgattcg	ccgcgtttac	2280
gggtgcttg	ccaatacggg	gcggtatctg	caggcgcgcg	ggtcgtgggtg	ggaggattgg	2340
ggacagcttt	cggggacggc	cgtgcgcgcc	cagggtgccc	agccccagag	caacgcgggc	2400
ccacgacccc	atatcgggga	cacgttatgt	accctgtttc	gggccccgga	ggtgctggcc	2460
cccaacggcg	acctgtataa	cgtgtttgcc	tgggccttgg	acgtcttggc	caaacgcctc	2520
cgtcccatgc	acgtctttat	cctggattac	gaccaatcgc	ccgcgcggctg	ccgggacgcc	2580
ctgctgcaac	ttacctccgg	gatggtccag	acccacgtca	ccaccccgag	ctccataccg	2640
acgatctgag	acctggcgcg	cacgtttgcc	cgggagatgg	gggaggctaa	cgccagcgcc	2700
gagggcagag	gcagcctgct	gacctgcggc	gacgtgaggg	agaaccccg	acctatgggt	2760
cgggggctgc	tcaggggctc	gtggcgctgc	cacatcgctc	tgtggacgcg	tatcgccagc	2820
acgatcccac	cgcacgttca	gaagtcggat	gtggaaatgg	aggcccagaa	agatgaaatc	2880
atctgcccc	gctgtaatag	gactgcccat	ccactgagac	atattaataa	cgacatgata	2940
gtcactgaca	acaacggtgc	agtcaagttt	ccacaactgt	gtaaaattttg	tgatgtgaga	3000
ttttccacct	gtgacaacca	gaaatcctgc	atgagcaact	gcagcatcac	ctccatctgt	3060
gagaagccac	aggaagtctg	tgtggctgta	tggagaaaga	atgacgagaa	cataacacta	3120
gagacagttt	gcatgacccc	caagctcccc	taccatgaat	ttattctgga	agatgctgct	3180
tctccaaagt	gcattatgaa	ggaaaaaaa	aagcctgggtg	agactttctt	catgtgttcc	3240
tgtagctctg	atgagtgcaa	tgacaacatc	atcttctcag	aagaatataa	caccagcaat	3300
cctgacttgt	tgctagtcat	atttcaagtg	acaggcatca	gcctcctgcc	accactggga	3360
gttgccatat	ctgtcatcat	catcttctac	tgctaccgcg	ttaaccggca	gcagaagctg	3420
taa						3423
SEQ ID NO: 100		CCR4(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFbRII - 氨基酸				
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTGGE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDF	LKISRVEAED	VGVYYCFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSGVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMNS	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGLV	TVSSSGTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFP	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGNQLYNE	LNLGRREYD	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPRG	SGATNFSLK	QAGDVEENPG	PMASYPCHQH	ASAFDQAARS	540
RGHSNRRTAL	RPRRQGEATE	VRLEQKMP	LRVYIDGPHG	MGKTTTTQLL	VALGSRDDIV	600
YVPEPMTYWQ	VLGASETIAN	IYTTQHRDQ	GEISAGDAV	VMTSAQITMG	MPYAVTDAVL	660
APHVGEAGS	SHAPPPALTL	IFDRHPAAL	LCYPAARYLM	GSMTQPAVLA	FVALIPPTLP	720
GTNIVLGALP	EDRHIDRLAK	RQRPGERLDL	AMLAAIRRVY	GLLANTVRYL	QGGGSSWEDW	780
QQLSGTAVFP	QGAEPQSNAG	PRPHIGDTLF	TLFRAPELLA	PNGDLYNVFA	WALDVLAKRL	840
RPMHVFIIDY	DQSPAGCRDA	LLQLTSGMVQ	THVTTGPSIP	TICDLARTFA	REMGEANGSG	900
EGRGSLTTCG	DVEENPGPMG	RGLLRGLWPL	HIVLWTRIAS	TIPPHVQKSD	VEMEAQKDEI	960
ICPSCNRTAH	PLRHINNDMI	VTNNNGAVKF	PQLCKFCDVR	FSTCDNQKSC	MSNCSITSIC	1020
EKPQEVCAVAV	WRKNDENITL	ETVCHDPKLP	YHDFILEDAA	SPKCIMKEKK	KPGETFFMCS	1080
CSSDECNDNI	IFSEYNTSN	PDLLLVIFQV	TGISLLPLLG	VAISVIIIFY	CYRVNRQQKL	1140
SEQ ID NO: 101		CCR4(KW_L2H) CAR - 核苷酸				
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccgatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccgtgtgac	acctggcgaa	120
cctgccaagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggt	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccgggttca	gcgccgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtggg	agccgaggac	gtggcgctgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aagggtgaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcgccggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggccctgg	aaaaggactg	600

[0291]

gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttcgggaac	cacgacgcca	840
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgctgc	agcccctgtc	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccacgcgg	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactgggt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgacagcgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgacaa	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgc	1497
SEQ ID NO: 102 CCR4(KW_L2H) CAR - 氨基酸						
MALPVTALLL	PLALLLHAAR	PGSDVLMTQS	PLSLPVTPE	PASISCRSSR	NIVHINGDTY	60
LEWYLQKPGQ	SPQLLIYKVS	NRFSGVPDRF	SGSGSGTDFT	LKISRVEAED	VGYYCYFQGS	120
LLPWTFGQGT	KVEIKGGGGS	GGGSGGGGGS	GGGSEVQLV	ESGGDLVQPG	RSLRLSCAAS	180
GFIFSNYGMS	WVRQAPGKGL	EWVATISSAS	TYSYYPDSVK	GRFTISRDN	KNSLYLQMN	240
LRVEDTALYY	CGRHSDGNFA	FGYWGQGT	TVSSSGTTTP	APRPPTPAPT	IASQPLSLRP	300
EACRPAAGGA	VHTRGLDFAC	DIYIWAPLAG	TCGVLLSLV	ITLYCKRGRK	KLLYIFKQPF	360
MRPVQTTQEE	DGCSCRFPEE	EEGGCELVRK	FSRSADAPAY	KQGQNQLYNE	LNLGRREEDY	420
VLDKRRGRDP	EMGGKPRRKN	PQEGLYNELQ	KDKMAEAYSE	IGMKGERRRG	KGHDGLYQGL	480
STATKDTYDA	LHMQUALPPR					499
SEQ ID NO: 103 P2A - 核苷酸						
ggaagcggag	ctactaactt	cagcctgctg	aagcaggctg	gagacgtgga	ggagaaccct	60
ggacct						66
SEQ ID NO: 104 P2A - 氨基酸						
GSATNFSLL	KQAGDVEENP	GP				22
SEQ ID NO: 105 HSVTK - 核苷酸						
atggcttcgt	acccctgcc	tcaacacgcg	tctgcgttcg	accaggctgc	gcgttctcgc	60
ggccatagca	accgacgtac	ggcgttgccg	cctcgccggc	agcaagaagc	cacggaagtc	120
cgcttgagc	agaaaatgcc	cacgctactg	cgggtttata	tagacggtcc	tcacgggatg	180
gggaaaacca	ccaccacgca	actgctggtg	gccctgggtt	cgcgcgacga	tatcgtctac	240
gtacccgagc	cgatgactta	ctggcaggtg	ctgggggctt	cagagacaat	cgcgaacatc	300
tacaccacac	aacaccgcct	cgaccagggc	gagatatcgg	ccggggacgc	ggcgggtgta	360
atgacaagcg	cccagataac	aatgggcatg	ccttatgccg	tgaccgacgc	cgttctggct	420
cctcatgtcg	ggggggaggc	tgggagttca	catgccccgc	ccccggccct	caccctcatc	480
ttcgaccgcc	atcccatcgc	cgccttcctg	tgctaccggg	cgcgcgcgata	ccttatgggc	540
agcatgaccc	cccaggccgt	gctggcggtc	gtggccctca	tcccgcgcac	cttgcccggc	600
acaaacatcg	tggtgggggc	ccttcgggag	gacagacaca	tcgaccgcct	ggccaaacgc	660
cagcgccccg	gcgagcggtc	tgacctggct	atgctggccg	cgttcgcgcg	cgtttacggg	720
ctgcttgcca	atacgttgcg	gtatctgcag	ggcggcggtg	cgtggtggga	ggattgggga	780
cagctttcgg	ggacggccgt	gccgcccag	ggtgccgagc	cccagagcaa	cgcgggcccc	840
cgaccccata	tcggggacac	gttatttacc	ctgtttcggg	cccccgagtt	gctggccccc	900
aacggcgacc	tgtataacgt	gtttgcctgg	gccttggaac	tcttgcccaa	acgcctccgt	960
cccattgcacg	tctttatcct	ggattacgac	caatgcgccg	ccggctgcgc	ggacgccttg	1020
ctgcaactta	cctccgggat	ggtccagacc	cacgtcacca	cccaggctc	cataccgacg	1080
atctgcgacc	tggcgcgcac	gtttgcccgg	gagatggggg	aggctaac		1128
SEQ ID NO: 106 HSVTK - 氨基酸						
MASYPCHQHA	SAFDQAARS	GHSNRRTALR	PRRQGEATEV	RLEQKMPTLL	RVIIDGPHGM	60
GKTTTTQLLV	ALGSRDDIVY	VPEPMTYWQV	LGASETIANI	YTTQHRLDQG	EISAGDAAVV	120
MTSAQITMGM	PYAVTDAVLA	PHVGGEAGSS	HAPPPALTLI	FDRHPAIAL	CYPAARYLMG	180
SMTQAVLAF	VALIPPTLPG	TNIVLGALPE	DRHIDRLAKR	QRPGERLDLA	MLAAIRRVYG	240
LLANTVRYLQ	GGGSWWEDWG	QLSGTAVFPQ	GAEPQSNAGP	RPHIGDTLFT	LFRAPPELLAP	300
NGDLYNVFAW	ALDVLAQLRL	PMHVFILDYD	QSPAGCRDAL	LQLTSGMVQT	HVTTPGSIPT	360
ICDLARTFAR	EMGEAN					376

[0292]

SEQ ID NO: 107	T2A – 核苷酸	
ggcagcggcg agggcagagg cagcctgctg acctgcggcg acgtggagga gaacccccgga		60
cct		63
SEQ ID NO: 108	T2A – 氨基酸	
GSGEGRGSLT TCGDVEENPG P		21
SEQ ID NO: 109	dnTGFbRII – 核苷酸	
atgggtcggg ggctgctcag gggcctgtgg cgcgtgcaca tcgtcctgtg gacgcgtatc		60
gccagcacga tcccaccgca cgttcagaag tcggatgtgg aaatggaggc ccagaaagat		120
gaaatcatct gccccagctg taataggact gccatccac tgagacatat taataacgac		180
atgatagtca ctgacaacaa cgggtgcagtc aagtttccac aactgtgtaa attttgtgat		240
gtgagathtt ccacctgtga caaccagaaa tcctgcatga gcaactgcag catcacctcc		300
atctgtgaga agccacagga agtctgtgtg gctgtatgga gaaagaatga cgagaacata		360
acactagaga cagtttgcca tgacccaag ctcccctacc atgactttat tctggaagat		420
gctgcttctc caaagtgcac tatgaaggaa aaaaaaagc ctggtgagac tttcttcatg		480
tggtcctgta gctctgatga gtgcaatgac aacatcatct tctcagaaga atataacacc		540
agcaatcctg acttgttgc agtcataatt caagtgcag gcacagcct cctgccacca		600
ctgggagttg ccatactctg catcatcatc ttctactgct accgcgttaa ccggcagcag		660
aagctgtaa		669
SEQ ID NO: 110	dnTGFbRII – 氨基酸	
MGRGLLRGLW PLHIVLWTRI ASTIPPHVQK SDVEMEAQKD EIICPSCNRT AHPLRHINND		60
MIVTDNNGAV KFPQLCKFCD VRFSTCDNQK SCMSNCSITS ICEKPQEVCV AVVRKNDENI		120
TLETVCHDPK LPYHDFIED AASPKCIMKE KKKPGETFFM CSCSSDECND NIIFSEEYNT		180
SNPDLLLVIQ QVTGISLLPP LGVAISVII FYCYRVNRQQ KL		222

[0293] C. 核酸和表达载体

[0294] 本公开提供编码CAR的核酸。本公开的核酸可包含编码本文公开的任一种CAR的多核苷酸序列。

[0295] 在某些方面中,本发明包括包含编码嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸序列的核酸,所述嵌合抗原受体包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域,其中抗原结合结构域包括:重链可变区,其包括三个重链互补决定区(HCDR),其中HCDR1包括SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,HCDR2包括SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列,以及HCDR3包括SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区(LCDR),其中LCDR1包括SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列,LCDR2包括SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列,以及LCDR3包括SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列。

[0296] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括由与SEQ ID NO:111具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的多核苷酸序列编码的重链可变区和/或由与SEQ ID NO:113具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的多核苷酸序列编码的轻链可变区。

[0297] 在某些实施方式中,抗原结合结构域是由与SEQ ID NO:15具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的多核苷酸序列编码的单链可变片段(scFv)。

[0298] 在某些实施方式中,本公开的核酸包括第一多核苷酸序列和第二多核苷酸序列。第一和第二多核苷酸序列可以通过连接体分隔。用于本公开的连接体允许多个蛋白由同一核酸序列(例如,多顺反子序列或双顺反子序列)编码,其被翻译为解离成单独的蛋白组分的多蛋白。在某些实施方式中,核酸从5'到3'包括第一多核苷酸序列、连接体和第二多核苷酸序列。在某些实施方式中,核酸从5'到3'包括第二多核苷酸序列、连接体和第一多核苷酸序列。

[0299] 在一些实施方式中,连接体包含编码内部核糖体进入位点(IRES)的核酸序列。如

本文所用,“内部核糖体进入位点”或“IRES”是指促进内部核糖体直接进入蛋白编码区的起始密码子(如ATG),进而引起对该基因的帽独立性(cap-independent)翻译的元件。各种内部核糖体进入位点是本领域技术人员已知的,其非限制地包括可获自以下的IRES:病毒或细胞mRNA来源,例如,免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP);血管内皮生长因子(VEGF);成纤维细胞生长因子2;胰岛素样生长因子;翻译起始因子eIF4G;酵母转录因子TFIID和HAP4;和可获自以下的IRES:例如,心病毒、鼻病毒、口蹄疫病毒、HCV、弗兰德鼠白血病毒(FrMLV)和莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的IRES。

[0300] 在一些实施方式中,连接体包含编码自切割肽的核酸序列。如本文所用,“自切割肽”或“2A肽”是指允许多个蛋白编码为多蛋白的寡肽,多蛋白在转录后解离成组分蛋白。术语“自切割”的使用不意图暗示蛋白水解切割反应。各种自切割肽或2A肽是本领域技术人员已知的,其非限制性包括在小核糖核酸病毒科病毒家族成员中发现的那些,例如,口蹄疫病毒(FMDV)、马甲型鼻炎病毒(ERAV)、明脉扁刺蛾 β 四体病毒(TaV)和猪捷申病毒-1(PTV-1);和心病毒如泰勒病毒(Theilovirus)和脑心肌炎病毒。源自FMDV、ERAV、PTV-1和TaV的2A肽在本文中分别被称为“F2A”、“E2A”、“P2A”和“T2A”。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的自切割肽。

[0301] 在一些实施方式中,连接体进一步包含编码弗林蛋白酶切割位点的核酸序列。弗林蛋白酶是无所不在地表达的蛋白酶,位于反式高尔基体中并在蛋白前体分泌前对其加工。弗林蛋白酶在其共有识别序列的COOH-末端切割。各种弗林蛋白酶共有识别序列(或“弗林蛋白酶切割位点”)是本领域技术人员已知的,其非限制地包括Arg-X1-Lys-Arg (SEQ ID NO:127)或Arg-X1-Arg-Arg (SEQ ID NO:128)、X2-Arg-X1-X3-Arg (SEQ ID NO:129)和Arg-X1-X1-Arg (SEQ ID NO:130),如Arg-Gln-Lys-Arg (SEQ ID NO:131),其中X1是任意天然存在的氨基酸,X2是Lys或Arg,并且X3是Lys或Arg。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的弗林蛋白酶切割位点。

[0302] 在一些实施方式中,连接体包含编码弗林蛋白酶切割位点和2A肽的组合的核酸序列。实例非限制地包括:包含编码弗林蛋白酶和F2A的核酸序列的连接体、包含编码弗林蛋白酶和E2A的核酸序列的连接体、包含编码弗林蛋白酶和P2A的核酸序列的连接体、包含编码弗林蛋白酶和T2A的核酸序列的连接体。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的组合。在这样的实施方式中,连接体可进一步包含在弗林蛋白酶和2A肽之间的间隔区序列。在一些实施方式中,连接体包括在2A肽5'的弗林蛋白酶切割位点。在一些实施方式中,连接体包括在弗林蛋白酶切割位点5'的2A肽。各种间隔区序列都是本领域已知的,其非限制地包括甘氨酸丝氨酸(GS)间隔区(也被称为GS连接体)如(GS)_n、(SG)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO:115)和(GGGGS)_n (SEQ ID NO:116),其中n代表至少为1的整数。示例性间隔区序列可包含氨基酸序列,其非限制地包括GGSG (SEQ ID NO:118)、GGSGG (SEQ ID NO:119)、GSGSG (SEQ ID NO:120)、GSGGG (SEQ ID NO:121)、GGGSG (SEQ ID NO:122)、GSSSG (SEQ ID NO:123)等。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的间隔区序列。

[0303] 在一些实施方式中,本公开的核酸可以可操作地连接至转录控制元件,例如,启动子和增强子等。合适的启动子和增强子元件是本领域技术人员已知的。

[0304] 在某些实施方式中,编码外源CAR的核酸与启动子可操作地连接。在某些实施方式中,启动子是磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子。

[0305] 为了在细菌细胞中表达,合适的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λ P和trc。为了在真核细胞中表达,合适的启动子包括但不限于轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子元件和增强子元件;巨细胞病毒即时早期启动子;单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;存在于来自逆转录病毒的长末端重复序列的启动子;小鼠金属硫蛋白-I启动子;和各种本领域已知的组织特异性启动子。合适的可逆启动子(包括可逆诱导型启动子)是本领域已知的。这样的可逆启动子可从多种生物体分离和源自多种生物体,例如,真核生物和原核生物。对源自第一生物体的可逆启动子的修饰用于第二生物体(例如,第一原核生物和第二真核生物、第一真核生物和第二原核生物等)是本领域公知的。这样的可逆启动子和基于这样的可逆启动子的系统还包含其它控制蛋白,包括但不限于醇调控启动子(例如,醇脱氢酶I(alcA)基因启动子、响应于醇反式激活蛋白(A1cR)的启动子等)、四环素调控启动子(例如,包括Tet激活子(TetActivators)、TetON、TetOFF等的启动子系统)、类固醇调控启动子(例如,大鼠糖皮质激素受体启动子系统、人雌性激素受体启动子系统、类视黄醇启动子系统、甲状腺启动子系统、蜕皮素启动子系统、米非司酮启动子系统等)、金属调控启动子(例如,金属硫蛋白启动子系统等)、发病机理相关调控启动子(例如,水杨酸调控启动子、乙烯调控启动子、苯并噻二唑调控启动子等)、温度调控启动子(例如,热诱导型启动子(例如,HSP-70、HSP-90、大豆热激启动子等)、光调控启动子、合成诱导型启动子等。

[0306] 在一些实施方式中,启动子是CD8细胞特异性启动子、CD4细胞特异性启动子、嗜中性粒细胞特异性启动子或NK特异性启动子。例如,可以使用CD4基因启动子;参见,例如,Salmon et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90:7739;和Marodon et al.(2003)Blood101:3416。作为另一实例,可以使用CD8基因启动子。可通过使用NcrI(p46)启动子实现NK细胞特异性表达;参见,例如,Eckelhart et al.Blood(2011)117:1565。

[0307] 为了在酵母细胞中表达,合适的启动子是组成型启动子,如ADH1启动子、PGK1启动子、ENO启动子、PYK1启动子等;或可调控启动子,如GAL1启动子、GAL10启动子、ADH2启动子、PHOS启动子、CUP1启动子、GALT启动子、MET25启动子、MET3启动子、CYC1启动子、HIS3启动子、ADH1启动子、PGK启动子、GAPDH启动子、ADC1启动子、TRP1启动子、URA3启动子、LEU2启动子、ENO启动子、TP1启动子和AOX1(例如,用于毕赤酵母属)。对适合的载体和启动子进行选择完全是在本领域普通技术人员的水平内的。用于原核宿主细胞的合适的启动子包括但不限于噬菌体T7 RNA聚合酶启动子;trp启动子;lac操纵子启动子;杂合启动子,例如,lac/tac杂合启动子、tac/trc杂合启动子、trp/lac启动子、T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子等;araBAD启动子;体内调控启动子,如ssaG启动子或相关启动子(参见,例如,美国专利公开号20040131637)、pagC启动子(Pulkkinen和Miller,J.Bacteriol.(1991)173(1):86-93;Alpuche-Aranda et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1992)89(21):10079-83)、nirB启动子(Harborne et al.Mol.Micro.(1992)6:2805-2813)等(参见,例如,Dunstan et al.,Infect.Immun.(1999)67:5133-5141;McKelvie et al.,Vaccine(2004)22:3243-3255;和Chatfield et al.,Biotechnol.(1992)10:888-892); σ 70启动子,例如,共有 σ 70启动子(参见,例如,GenBank登录号AX798980、AX798961和AX798183);稳定期启动子,例如,dps启动子、spv启动子等;源自毒力岛SPI-2(pathogenicity island SPI-2)的启动子(参见,例如,W096/17951);actA启动子(参见,例如,Shetron-Rama et al.,Infect.Immun.(2002)70:

1087-1096); rpsM启动子(参见,例如,Valdivia和Falkow *Mol. Microbiol.* (1996) .22: 367); tet启动子(参见,例如,Hillen, W.和Wissmann, A. (1989) In Saenger, W.和Heinemann, U. (eds), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein--Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, 第10卷, 第143-162页); SP6启动子(参见,例如, Melton et al., *Nucl. Acids Res.* (1984) 12:7035); 等等。用于原核生物(如大肠杆菌)的合适的强启动子包括但不限于Trc、Tac、T5、T7和P Λ 。用于细菌宿主细胞的操纵子的非限制性实例包括乳糖启动子操纵子(当与乳糖接触时, LacI抑制蛋白改变构象, 进而防止Lac抑制蛋白与操纵子结合)、色氨酸启动子操纵子(当与色氨酸复合时, TrpR抑制蛋白具有结合操纵子的构象; 在色氨酸不存在时, TrpR抑制蛋白具有不与操纵子结合的构象)和tac启动子操纵子(参见,例如, deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1983) 80:21-25)。

[0308] 合适的启动子的其它实例包括即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。此启动子序列是强组成型启动子序列, 能够驱动与其可操作地连接的任意多核苷酸序列的高水平表达。还可以使用其它组成型启动子序列, 包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)或人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒即时早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、EF-1 α 启动子, 以及人基因启动子, 诸如但不限于, 肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。进一步, 本发明不应限于组成型启动子的使用。诱导型启动子也被考虑作为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关, 该分子开关能够能够开启诱导型启动子可操作地连接的多核苷酸序列的表达(当期望这种表达时), 或使该表达关闭(当不期望该表达时)。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白(metallothionine)启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0309] 在一些实施方式中, 含有合适的启动子的基因座或构建体或转基因通过诱导系统的诱导, 是不可逆地开关的。用于诱导不可逆开关的合适的系统是本领域公知的, 例如, 不可逆开关的诱导可利用Cre-lox介导的重组(参见, 例如, Fuhrmann-Benzakein, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 28:e99, 其公开内容通过引用并入本文)。本领域已知的重组酶、核酸内切酶、连接酶、重组位点等的任意合适的重组都可用于产生不可逆地开关的启动子。本文别处描述的用于执行位点特异性重组的方法、机理和要求可用于产生不可逆地开关的启动子, 并且是本领域公知的, 参见, 例如, Grindley et al. *Annual Review of Biochemistry* (2006) 567-605; and Tropp, *Molecular Biology* (2012) (Jones&Bartlett Publishers, Sudbury, Mass.) (其公开内容通过引用并入本文)。

[0310] 在一些实施方式中, 本公开的核酸进一步包含编码CAR诱导表达盒的核酸序列。在一个实施方式中, CAR诱导表达盒用于产生一经CAR信号传导就释放的转基因多肽产物。参见, 例如, Chmielewski和Abken, *Expert Opin. Biol. Ther.* (2015) 15(8):1145-1154; 和 Abken, *Immunotherapy* (2015) 7(5):535-544。在一些实施方式中, 本公开的核酸进一步包含编码可操作地连接至T-细胞激活响应启动子的细胞因子的核酸序列。在一些实施方式中, 可操作地连接至T-细胞激活响应启动子的细胞因子存在于单独的核酸序列上。在一个实施方式中, 细胞因子是IL-12。

[0311] 本公开的核酸可存在于表达载体和/或克隆载体内。表达载体可包括可选标记物、复制起始点和提供载体的复制和/或维护的其它特征。合适的表达载体包括, 例如, 质粒、病

毒载体等。本领域技术人员已知多种合适的载体和启动子;很多都可商业获得以用于产生对象重组构建体。以下载体通过实例的方式提供,并且不应以任何方式解释为是限制性的:细菌的:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540和pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, 瑞典)。真核生物的:pWNeo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL (Pharmacia)。

[0312] 表达载体通常具有靠近启动子序列的便利的限制性位点,以提供编码异源蛋白质的核酸序列的插入。在表达宿主中有效的 (operative) 可选标记物可以存在。合适的表达载体包括但不限于病毒载体 (例如基于以下的病毒载体:牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒 (参见,例如, Li et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1994) 35:2543-2549; Borraset al., Gene Ther. (1999) 6:515-524; Li和Davidson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:7700-7704; Sakamoto et al., H. Gene Ther. (1999) 5:1088-1097; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984和WO 95/00655); 腺相关病毒 (参见,例如, Ali et al., Hum. Gene Ther. (1998) 9:81-86, Flannery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:6916-6921; Bennett et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1997) 38:2857-2863; Jomary et al., Gene Ther. (1997) 4:683-690, Rolling et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10:641-648; Ali et al., Hum. Mol. Genet. (1996) 5:591-594; Srivastava in WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; 和 Flotte et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:10613-10617); SV40; 单纯疱疹病毒; 人免疫缺陷病毒 (参见,例如, Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:10319-23; Takahashi et al., J. Virol. (1999) 73:7812-7816); 逆转录病毒载体 (例如, 鼠白血病病毒、脾坏死病毒和源自以下逆转录病毒的载体: 如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒); 等等。

[0313] 适合使用的其它表达载体是, 例如, 但不限于慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体、工程改造的杂合病毒载体、转座子介导的载体等。病毒载体技术在本领域是公知的, 并且例如在 Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Press, NY) 和其它病毒学和分子生物学手册中描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。

[0314] 总体上, 合适的载体包含在至少一种生物体中具有功能的复制起始点、启动子序列、便利的限制性核酸内切酶位点和一个或多个可选标记物 (例如, WO 01/96584; WO 01/29058; 和美国专利号6,326,193)。

[0315] 在一些实施方式中, 表达载体 (例如, 慢病毒载体) 可用于将CAR导入到免疫细胞或其前体 (例如, T细胞) 中。因此, 本发明的表达载体 (例如, 慢病毒载体) 可包含编码CAR的核酸。在一些实施方式中, 表达载体 (例如, 慢病毒载体) 将包含将辅助其中所编码的CAR的功能表达的其它元件。在一些实施方式中, 包含编码CAR的核酸的表达载体进一步包含哺乳动物启动子。在一个实施方式中, 载体进一步包含延长因子-1- α 启动子 (EF-1 α 启动子)。EF-1 α 启动子的使用可提高下游转基因 (例如, 编码CAR的核酸序列) 表达的效率。生理启动子 (例如, EF-1 α 启动子) 不太可能诱导整合介导的基因毒性, 而可能废除逆转录病毒载体转化干

细胞的能力。适用于载体(例如,慢病毒载体)的其它生理启动子对本领域技术人员是已知的,并且可并入到本发明的载体中。在一些实施方式中,载体(例如,慢病毒载体)进一步包含可提供可提高滴定度和基因表达的非必需顺式作用序列。非必需顺式作用序列的一个非限制实例是中心多聚嘌呤区(central polypurine tract)和中心终止序列(cPPT/CTS),其对高效逆转录和核输入是很重要的。其它非必需顺式作用序列对本领域技术人员是已知的,并且可并入到本发明的载体(例如,慢病毒载体)中。在一些实施方式中,载体进一步包含转录后调控元件。转录后调控元件可提高RNA转录、提高转基因表达和稳定RNA转录物。转录后调控元件的一个实例是土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。因此,在一些实施方式中,本发明的载体进一步包含WPRE序列。各种转录后调控元件对本领域技术人员是已知的,并且可并入到本发明的载体(例如,慢病毒载体)中。本发明的载体可进一步包含其它元件如用于RNA运输、包装序列的rev应答元件(RRE)以及和5'和3'长末端重复序列(LTR)。术语“长末端重复序列”或“LTR”是指碱基对的位于逆转录病毒DNA末端的包含U3、R和U5区域的结构域。LTR总体上提供逆转录病毒基因表达(例如,启动、起始和基因转录物的聚腺苷酸化)和病毒复制所需的功能。在一个实施方式中,本发明的载体(例如,慢病毒载体)包括3' U3缺失的LTR。因此,本发明的载体(例如,慢病毒载体)可包含本文所述的元件的任意组合,以增强转基因的功能表达的效率。例如,本发明的载体(例如,慢病毒载体)除编码CAR的核酸外可包括WPRE序列、cPPT序列、RRE序列、5' LTR、3' U3缺失的LTR'。

[0316] 本发明的载体可以是自失活载体。如本文所用,术语“自失活载体”是指3' LTR增强启动子区(U3区)已被修饰(例如,通过缺失或取代)的载体。自失活载体可防止病毒转录超出第一轮病毒复制。因此,自失活载体能够感染,然后仅一次就能整合到宿主基因组(例如,哺乳动物基因组)中,并且无法进一步去除(passed)。因此,自失活载体可大大地降低产生具有复制能力的病毒的风险。

[0317] 在一些实施方式中,本发明的核酸可以是RNA,例如,体外合成的RNA。用于体外合成RNA的方法是本领域技术人员已知的;可以使用任何已知的方法来合成包含编码本公开的CAR的序列的RNA。用于将RNA导入到宿主细胞的方法是本领域已知的。参见,例如,Zhao et al. *Cancer Res.* (2010) 15:9053。将包含编码本公开的CAR的核苷酸序列的RNA导入到宿主细胞可在体外或离体或者体内实施。例如,可用包含编码本公开的CAR的核苷酸序列的RNA将宿主细胞(例如,NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞等)体外或离体电穿孔。

[0318] 为了评估多肽或其部分的表达,待导入细胞的表达载体还可以包含可选标记基因或报告基因,或两者,以促进从寻求通过病毒载体转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在一些实施方式中,可选标记物可携带在单独的DNA片段上并在共转染程序中使用。可选标记物和报告基因的两侧都可以有适当的调控序列,以能够在宿主细胞中表达。有用的可选标记物非限制地包括抗生素抗性基因。

[0319] 报告基因用于鉴定潜在转染的细胞和用于评价调控序列的功能性。一般来说,报告基因是不存在于受体生物体或组织中或由其表达的编码多肽的基因,该多肽的表达通过某些易于检测的特性(例如,酶活性)来表现。报告基因的表达在DNA导入受体细胞后的适当时间进行评估。合适的报告基因可非限制地包括编码萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因,或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei et al., 2000 *FEBS Letters* 479:79-82)。

[0320] 在一些实施方式中,提供本公开的核酸用于例如在哺乳动物细胞中产生本文所述的CAR。在一些实施方式中,本公开的核酸提供编码CAR的核酸的扩增。

[0321] D. 修饰的免疫细胞

[0322] 本发明提供包括本文所述的CAR的修饰的免疫细胞或其前体(例如,T细胞)。还提供包括编码CAR的核酸的修饰的免疫细胞或其前体细胞。因此,这种修饰的细胞具有由在其中表达的CAR指导的特异性。例如,本公开的包括CAR的修饰细胞对靶细胞(例如,癌细胞)上的CCR4具有特异性。一方面,本发明提供治疗癌症的方法,包括向患有癌症的对象施用包括抗CCR4 CAR的修饰细胞,其中修饰细胞耗竭对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞,从而治疗癌症。

[0323] 还提供修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包括编码CAR并进一步编码安全开关的核酸,其中安全开关在施用安全开关剂时在对象中引发CAR T细胞耗竭。CAR可通过本文所述的2A自切割序列如P2A或T2A序列与安全开关连接。因此,安全开关耗竭系统包括通过可自切割连接体与安全开关连接的抗CCR4 CAR(即,CAR连接安全开关)并进一步包括安全开关剂。在一个实施方式中,安全开关是截短的EGFR(EGFRt),而安全开关剂是抗EGFR抗体如西妥昔单抗。在一个实施方式中,安全开关是CD20,而安全开关剂是抗CD20抗体,如利妥昔单抗。在一个实施方式中,安全开关是诱导型胱天蛋白酶9,而安全开关剂是二聚化药物如AP1903。在一个实施方式中,安全开关是单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSVTK),而安全开关剂是更昔洛韦(GCV)。

[0324] 在某些实施方式中,CAR连接安全开关还包括显性负性II型TGFb受体(dnTGFbRII)。在一些实施方式中,例如通过本文所述的2A自切割序列如P2A或T2A序列将CAR连接安全开关的CAR与dnTGFbRII连接。在一些实施方式中,CAR连接安全开关的安全开关例如经由本文所述的2A自切割序列如P2A或T2A序列与dnTGFbRII连接。在一些实施方式中,CAR连接安全开关的CAR和安全开关各自例如经由2A自切割序列如P2A或T2A序列与dnTGFbRII连接。在一些实施方式中,CAR连接安全开关包括抗CCR4 CAR、HSVTK安全开关和dnTGFbRII,其中抗CCR4 CAR、HSVTK和dnTGFbRII可以以从CAR连接安全开关的N-末端到C-末端的任何顺序存在。

[0325] 在一些实施方式中,CAR连接安全开关包括SEQ ID NO:42、52、60、68、76、88和100中列出的氨基酸序列中的任一个。CAR序列和CAR连接安全开关序列的容许的变化是本领域技术人员已知的。例如,在某些实施方式中,CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中任一个列出的氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR连接安全开关包括与SEQ ID NO:42、52、60、68、76、88和100中列出的氨基酸序列中的任一个具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0326] 一方面,本发明包括修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包括CAR,CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。另一方面,本发明包括修饰的免疫细胞或其前体

细胞,其包括编码CAR的核酸,CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。在一些实施方式中,核酸还编码安全开关,其中安全开关在施用安全开关剂后在对象中引发CAR T细胞耗竭。

[0327] 在某些实施方式中,修饰细胞是修饰的免疫细胞。在某些实施方式中,修饰细胞是自体细胞。在某些实施方式中,修饰细胞是从人对象获得的自体细胞。在某些实施方式中,修饰细胞是T细胞。

[0328] 在某些实施方式中,修饰的免疫细胞或其前体细胞被进一步修饰以相对于未修饰的免疫细胞中的CCR4表达水平降低或消除CCR4表达。细胞中CCR4的敲低(k/d)或敲除(k/o)可在CCR4-CAR转导之前、与此同时或在其之后实现。在一些实施方式中,CCR4 k/d或k/o可通过本领域已知的用于基因k/d或k/o的任意方法实现,诸如用RNAi(shRNA或siRNA)、基因工程(例如,通过CRISPR/Cas9),或用基于蛋白质的系统(例如,具有一个或多个C-末端KDEL基序的抗CCR4 scFv)修饰细胞。在一些实施方式中,修饰的免疫细胞或其前体细胞还包括以下一项或多项:(a) CCR4无效敲除等位基因;(b) 被抑制的CCR4基因表达;和(c) 包括抗CCR4 scFv和KDEL基序的融合蛋白和/或编码所述融合蛋白的核酸。在某些实施方式中,CCR4无效敲除等位基因或被抑制的CCR4基因表达是通过包括选自以下的核酸酶的基因工程技术获得的:成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和锌指核酸酶。在一些实施方式中,修饰的免疫细胞或其前体细胞还包括抑制CCR4基因表达的抑制性RNA分子。抑制性RNA分子的实例包括但不限于RNA干扰(RNAi) RNA、短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、反式作用siRNA(tasiRNA)、微小RNA(miRNA)、反义RNA(asRNA)、长非编码RNA(lncRNA)、CRISPR RNA(crRNA)、反式激活crRNA(tracrRNA)、指导RNA(gRNA)、单指导RNA(sgRNA)、双链RNA(dsRNA)、核酶及其任意组合。

[0329] 在一些实施方式中,用CCR4靶向RNA(例如shRNA)或用编码shRNA的核酸进一步修饰修饰的免疫细胞或其前体细胞。在一些实施方式中,用CCR4靶向RNA(例如,指导RNA)和Cas核酸酶或用编码CCR4靶向RNA和Cas核酸酶的核酸进一步修饰细胞。在一些实施方式中,用抗CCR4 scFv-KDEL基序融合蛋白或用编码抗CCR4 scFv-KDEL基序融合蛋白的核酸进一步修饰细胞。

[0330] 在一些实施方式中,修饰的免疫细胞还包括CCR4靶向shRNA(sh-CCR4)。表4中显示了示例性sh-CCR4序列以及对照shRNA(即Cre重组酶靶向shRNA序列(sh-Cre))。在一些实施方式中,CCR4是具有NCBI登录号为NM_005508.4的mRNA序列的人CCR4。在一些实施方式中,Cre基因序列是NCBI登录号为NC_005856.1的Cre基因序列。在一些实施方式中,修饰的免疫细胞还包括包含SEQ ID NO:144-147中任一个的CCR4靶向shRNA或编码包含SEQ ID NO:144-147中任一个的CCR4靶向shRNA的核酸。在一些实施方式中,修饰的免疫细胞还包括编码CCR4靶向shRNA的核酸,其中核酸包括SEQ ID NO:149-152。

[0331] 表4:shRNA序列

[0332]

SEQ ID NO.	shRNA	靶向区
144	sh-CCR4#1	1519-1541
GAAUGAAGUUGUAGGUAAUAUcugugaagccacagaugggAUUUACCUACAACUUCAUUCuuuuuu		
145	sh-CCR4#2	1482-1504
GCAUGAGUCAGUCUGAUGAGAcugugaagccacagaugggUCUCAUCAGACUGACUCAUGCuuuuuu		
146	sh-CCR4#3	1609-1631
GCUGAUGGAGUAAAUCGCUACcugugaagccacagaugggGUAGCGAUUUACUCCAUCAGCuuuuuu		

[0333]

uuuuuu		
147	sh-CCR4#4	1526-1548
GUUGUAGGUAAUAUUGCAAGGcugugaagccacagaugggCCUUGCAAUAUUACCUACAACuuuuuu		
148	sh-Cre	811-833
GAUUUACGGCGCUAAGGAUGAcugugaagccacagaugggUCAUCCUUAGCGCCGUAAAUCuuuuuu		
SEQ ID NO.	编码 shRNA 的 DNA	靶向区
149	sh-CCR4#1	1519-1541
GAATGAAGTTGTAGGTAATATctgtgaagccacagatgggATATTACCTACAACCTTCATTcttttt		
150	sh-CCR4#2	1482-1504
GCATGAGTCAGTCTGATGAGActgtgaagccacagatgggTCTCATCAGACTGACTCATGcttttt		
151	sh-CCR4#3	1609-1631
GCTGATGGAGTAAATCGCTACctgtgaagccacagatgggGTAGCGATTTACTCCATCAGcttttt		
152	sh-CCR4#4	1526-1548
GTTGTAGGTAATATTGCAAGGctgtgaagccacagatgggCCTTGCAATATTACCTACAACcttttt		
153	sh-Cre	811-833
GATTTACGGCGCTAAGGATGActgtgaagccacagatgggTCATCCTTAGCGCCGTAAATCcttttt		

[0334] 在某些实施方式中,修饰的免疫细胞源自患者的外周血单核细胞(PBMC)。因此,在一些实施方式中,PBMC包括肿瘤细胞。在一些实施方式中,对象先前已经施用莫格利珠单抗。在一些实施方式中,癌症是莫格利珠单抗难治的。

[0335] E. 治疗方法

[0336] 本文所述的修饰细胞(例如,T细胞)可包括在用于免疫疗法的组合物中。组合物可包括药物组合物,并且还包括药学上可接受的载体。可施用治疗有效量的包括修饰的T细胞的药物组合物。

[0337] 一方面,本发明包括用于过继性细胞转移疗法的方法,包括向有需要的对象施用本发明的修饰的T细胞。另一方面,本发明包括治疗对象的疾病或状况的方法,包括向对其有需要的对象施用修饰的T细胞群。一方面,本发明提供治疗癌症的方法,包括向患有癌症

的对象施用包括抗CCR4 CAR的修饰细胞,其中修饰细胞耗竭对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞,从而治疗癌症。

[0338] 施用免疫细胞以用于过继性细胞疗法的方法是已知的,并且可结合所提供的方法和组合物使用。例如,过继性T细胞疗法方法在授权Gruenberg et al.的美国专利申请公开号2003/0170238;授权Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8 (10):577-85) 中进行了描述。参见,例如,Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31 (10):928-933;Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4):e61338。在一些实施方式中,细胞疗法(例如,过继性T细胞疗法)通过自体转移进行,其中细胞从待接受细胞疗法的对象中分离或以其它方式从待接受细胞疗法的对象制备,或来自源自这样的对象的样品。因此,在某些方面中,细胞源自对象(例如,需要治疗的患者),并且细胞在分离和处理之后被施用至同一个对象。

[0339] 在一些实施方式中,细胞疗法(例如,过继性T细胞疗法)通过同种异体转移来实施,其中细胞从除了待接受或最终接受细胞疗法的对象以外的对象(例如,第一对象)分离和/或以其它方式制备。在这样的实施方式中,然后将细胞施用至同一物种的不同对象,例如,第二对象。在一些实施方式中,第一和第二对象在遗传上是相同的。在一些实施方式中,第一和第二对象在遗传上是相似的。在一些实施方式中,第二对象表达与第一对象相同的HLA类别或超型。

[0340] 在一些实施方式中,在施用细胞或含有细胞的组合物之前,对象已用靶向疾病或状况(例如,肿瘤)的治疗剂治疗过。在一些方面中,对象是其它治疗剂是难治的或对其无反应。在一些实施方式中,对象例如在用其它治疗干预(包括化疗、放射和/或造血干细胞移植(HSCT),例如,同种异体HSCT)治疗之后患有持久性或复发性疾病。在一些实施方式中,对象先前已经施用莫格利珠单抗。在一些实施方式中,癌症是莫格利珠单抗难治的。在一些实施方式中,尽管对象已对其它疗法(例如,莫格利珠单抗)产生抗性,但施用仍有效地治疗对象。

[0341] 在一些实施方式中,对象对其它治疗剂有反应,并且用该治疗剂治疗减轻了疾病负担。在一些方面中,对象最初对治疗剂有反应,但随着时间的推移表现出疾病或状况的复发。在一些实施方式中,对象没有复发。在一些这样的实施方式中,对象被确定处于复发风险,诸如处于高复发风险,因此预防性地施用细胞,从而例如降低复发的可能性或防止复发。在一些方面中,对象之前没有接受其它治疗剂的治疗。

[0342] 在一些实施方式中,对象例如在用其它治疗干预(包括化疗、放射和/或造血干细胞移植(HSCT),例如,同种异体HSCT)治疗之后患有持久性或复发性疾病。在一些实施方式中,尽管对象已对其它疗法产生抗性,但施用仍有效地治疗对象。

[0343] 本发明的修饰的免疫细胞可施用于动物,优选哺乳动物,甚至更优选人,以治疗癌症。此外,本发明的细胞可用于任何与癌症相关的状况的治疗,特别是针对肿瘤细胞(一种或多种)的细胞介导的免疫反应,其中需要治疗或减轻该疾病。用本发明的修饰细胞或药物组合物治疗的癌症的类型包括某些白血病或淋巴样恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤以及恶性肿瘤,例如肉瘤、癌和黑素瘤。示例性癌症包括但不限于成熟T细胞恶性肿瘤,例如成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)等,以及结直肠

癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、淋巴瘤和肝细胞癌。癌症可以是非实体肿瘤(如血液肿瘤)或实体肿瘤。成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症也包括在内。在一个实施方式中,癌症是实体肿瘤或血液肿瘤。在某些实施方式中,癌症是白血病和/或淋巴瘤。在某些实施方式中,癌细胞表达CCR4。

[0344] 就经历疗法的对象而言,待施用的本发明的细胞可以是自体的。

[0345] 本发明的细胞的施用可以本领域技术人员已知的任何便利的方式实施。本发明的细胞可通过雾化吸入、注射、摄取、输注、植入或移植施用于对象。本文所述的组合物可经动脉、皮下、皮内、瘤内、节内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用于患者。在其它情况下,将本发明的细胞直接注射到对象的炎症部位、对象的局部疾病部位、淋巴结、器官、肿瘤等。

[0346] 在一些实施方式中,以所需剂量(dosage)施用细胞,所需剂量在一些方面中包括所需的剂量(dose)或细胞数或细胞类型(一种或多种)和/或所需的细胞类型比。因此,在一些实施方式中,细胞的剂量基于细胞的总数(或每kg体重的数量)和单独的群体或亚型的所需比,诸如CD4⁺与CD8⁺的比。在一些实施方式中,细胞的剂量基于单独的群体或单独的细胞类型中所需细胞总数(或每kg体重的数量)。在一些实施方式中,剂量基于这样的特征的组合,如单独的群体中所需的总细胞数、所需的比和所需的细胞总数。

[0347] 在一些实施方式中,在总细胞的所需剂量(如T细胞的所需剂量)的容许差异下或在该容许差异内施用细胞群或细胞亚型(如CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞)。在一些方面中,所需剂量是所需的细胞数或施用细胞的对象的每单位体重所需的细胞数,例如,细胞数/kg。在一些方面中,所需剂量等于最小细胞数或每单位体重最小细胞数,或在最小细胞数或每单位体重最小细胞数以上。在一些方面中,在以所需剂量施用的总细胞中,单独的群体或亚型以所需的输出比(如CD4⁺与CD8⁺的比)或接近所需的输出比(例如,在这种比的某个容许差异或误差内)存在。

[0348] 在一些实施方式中,在一种或多种单独的细胞群或细胞亚型的所需剂量(如CD4⁺细胞的所需剂量和/或CD8⁺细胞的所需剂量)的容许差异下或在该容许差异内施用细胞。在一些方面中,所需剂量是该亚型或群体细胞的所需数量,或是施用细胞的对象的每单位体重此类细胞的所需数量,例如,细胞数/kg。在一些方面中,所需剂量等于该群体或亚型细胞的最小数或在该群体或亚型细胞的最小数以上,或等于每单位体重该群体或亚型细胞的最小数或在每单位体重该群体或亚型细胞的最小数以上。因此,在一些实施方式中,剂量基于总细胞的所需的固定剂量和所需的比,和/或基于单独的亚型或亚群中一种或多种(例如,每一种)的所需的固定剂量。因此,在一些实施方式中,剂量基于T细胞的所需的固定剂量或最小剂量和CD4⁺与CD8⁺细胞的所需的比,和/或基于CD4⁺和/或CD8⁺细胞的所需的固定剂量或最小剂量。

[0349] 在某些实施方式中,这些细胞,或细胞亚型的单独的群体以如下范围向对象施用:约100万至约1000亿个细胞,诸如,例如,100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约250万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞,或上述值中任意两个所限定的范围),如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约

750亿个细胞、约900亿个细胞,或上述值中任意两个所限定的范围),并且在某些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或在这些范围内的任意值。

[0350] 在一些实施方式中,总细胞的剂量和/或细胞的单独亚群的剂量在以下范围内:在等于或约 1×10^5 个细胞/kg至约 1×10^{11} 个细胞/kg之间, 10^4 ,和等于或约 10^{11} 个细胞/千克(kg)体重,如在 10^5 与 10^6 个细胞/kg体重之间,例如,等于或约 1×10^5 个细胞/kg体重、 1.5×10^5 个细胞/kg体重、 2×10^5 个细胞/kg体重或 1×10^6 个细胞/kg体重。例如,在一些实施方式中,在以下某个误差范围下或在该误差范围内施用细胞:在等于或约 10^4 与等于或约 10^9 个T细胞/千克(kg)体重之间,如在 10^5 与 10^6 个T细胞/kg体重之间,例如,等于或约 1×10^5 个T细胞/kg体重、 1.5×10^5 个T细胞/kg体重、 2×10^5 个T细胞/kg体重或 1×10^6 个T细胞/kg体重。在其它示例性实施方式中,用于本公开方法的修饰的细胞的合适的剂量范围非限制地包括约 1×10^5 个细胞/kg至约 1×10^6 个细胞/kg、约 1×10^6 个细胞/kg至约 1×10^7 个细胞/kg、约 1×10^7 个细胞/kg至约 1×10^8 个细胞/kg、约 1×10^8 个细胞/kg至约 1×10^9 个细胞/kg、约 1×10^9 个细胞/kg至约 1×10^{10} 个细胞/kg、约 1×10^{10} 个细胞/kg至约 1×10^{11} 个细胞/kg。在示例性实施方式中,用于本公开方法的合适的剂量是约 1×10^8 个细胞/kg。在示例性实施方式中,用于本公开方法的合适的剂量是约 1×10^7 个细胞/kg。在其它实施方式中,合适的剂量是约 1×10^7 个总细胞至约 5×10^7 个总细胞。在一些实施方式中,合适的剂量是约 1×10^8 个总细胞至约 5×10^8 个总细胞。在一些实施方式中,合适的剂量是约 1.4×10^7 个总细胞至约 1.1×10^9 个总细胞。在示例性实施方式中,用于本公开方法的合适的剂量是约 7×10^9 个总细胞。

[0351] 在一些实施方式中,在以下某个误差范围下或在该误差范围内施用细胞:在等于或约 10^4 与等于或约 10^9 个CD4⁺和/或CD8⁺细胞/千克(kg)体重之间,如在 10^5 与 10^6 个CD4⁺和/或CD8⁺细胞/kg体重之间,例如,等于或约 1×10^5 个CD4⁺和/或CD8⁺细胞/kg、 1.5×10^5 个CD4⁺和/或CD8⁺细胞/kg体重、 2×10^5 个CD4⁺和/或CD8⁺细胞/kg体重或 1×10^6 个CD4⁺和/或CD8⁺细胞/kg体重。在一些实施方式中,在以下某个误差范围下或在该误差范围内施用细胞:大于,和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 或约 9×10^6 个CD4⁺细胞,和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 或约 9×10^6 个CD8⁺细胞,和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 或约 9×10^6 个T细胞。在一些实施方式中,在以下某个误差范围下或在该误差范围内施用细胞:在约 10^8 与 10^{12} 个T细胞之间或在约 10^{10} 与 10^{11} 个T细胞之间、在约 10^8 与 10^{12} 个CD4⁺细胞之间或在约 10^{10} 与 10^{11} 个CD4⁺细胞之间和/或在约 10^8 与 10^{12} 个CD8⁺细胞之间或在约 10^{10} 与 10^{11} 个CD8⁺细胞之间。

[0352] 在一些实施方式中,在多个细胞群或亚型(如CD4⁺和CD8⁺细胞或亚型)的所需的输出比的容许范围下或在该容许范围内施用细胞。在一些方面中,所需的比可以是具体的比或者可以是比的范围,例如,在一些实施方式中,所需的比(例如,CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比)在等于或约5:1与等于或约5:1(或大于约1:5与小于约5:1)之间,或在等于或约1:3与等于或约3:1(或大于约1:3与小于约3:1)之间,如在等于或约2:1与等于或约1:5之间(或大于约1:5与小于约2:1之间,如等于或约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9:1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5)。在一些方面中,容许

差异在所需的比的约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%内,包含这些范围之间的任意值。

[0353] 在一些实施方式中,以单剂量或多剂量向有需要的对象施用修饰细胞的剂量。在一些实施方式中,以多剂量施用修饰细胞的剂量,例如,一周一次或每7天一次、每2周一次或每14天一次、每3周一次或每21天一次、每4周一次或每28天一次。在示例性实施方式中,向有需要的对象施用单剂量的修饰细胞。在示例性实施方式中,通过快速静脉内输注向有需要的对象施用单剂量的修饰细胞。

[0354] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可取决于待治疗疾病的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和过程、是否出于预防或治疗目的施用细胞、先前疗法、对象的临床病史和对细胞的反应以及主治医师的判断。在一些实施方式中,组合物和细胞一次或通过一系列治疗适当地施用于对象。

[0355] 在一些实施方式中,作为组合治疗的一部分来施用细胞,诸如与其它治疗性干预(如抗体或工程改造的细胞或受体或剂,如细胞毒性剂或治疗剂)同时施用或以任意顺序与其按顺序施用。在一些实施方式中细胞同时或以任意顺序按顺序与一种或多种其它治疗剂共同施用,或结合另一治疗性干预施用。在一些情况下,细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同施用使得细胞群增强一种或多种其它治疗剂的效果,反之亦然。在一些实施方式中,在一种或多种其它治疗剂之前施用细胞。在一些实施方式中,在一种或多种其它治疗剂之后施用细胞。在一些实施方式中,一种或多种其它试剂包括细胞因子,如IL-2,从而例如增强持久性。在一些实施方式中,方法包括化疗剂的施用。

[0356] 在某些实施方式中,本发明的修饰细胞(例如,包含CAR的修饰细胞)可与免疫检查点抗体(例如,抗PD-1、抗CTLA-4或抗PDL1抗体)组合施用于对象。例如,修饰细胞可与靶向例如PD-1(程序性死亡1蛋白)的抗体或抗体片段组合施用。抗PD-1抗体的实例包括但不限于派姆单抗(pembrolizumab) (KEYTRUDA®,以前是lambrolizumab,也称为MK-3475)和纳武单抗(nivolumab) (BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、OPDIVA®)或其抗原结合片段。在某些实施方式中,修饰细胞可以与抗PD-L1抗体或其抗原结合片段组合施用。抗PD-L1抗体的实例包括但不限于BMS-936559、MPDL3280A (TECENTRIQ®,阿特珠单抗(Atezolizumab)) 和 MEDI4736 (德瓦鲁单抗(Durvalumab), Imfinzi)。在某些实施方式中,修饰细胞可以与抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段组合施用。抗CTLA-4抗体的实例包括但不限于伊匹单抗(Ipilimumab) (商品名Yervoy)。也可以使用其它类型的免疫检查点调节剂,包括但不限于小分子、siRNA、miRNA和CRISPR系统。免疫检查点调节剂可以在包含CAR的修饰细胞之前、之后或与其同时施用。在某些实施方式中,包含免疫检查点调节剂的组合治疗可提高包含本发明修饰细胞的疗法的治疗功效。

[0357] 在细胞施用后,在一些实施方式中,例如通过多种已知方法中的任意种来测量的工程改造的细胞群的生物活性。评估参数包括工程改造的或天然的T细胞或其它免疫细胞在体内(例如,通过成像)或在体外(例如,通过ELISA或流式细胞术)与抗原的特异性结合。在某些实施方式中,可使用本领域已知的任何合适的方法测量工程改造的细胞破坏靶细胞的能力,诸如,例如Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32 (7) : 689-702 (2009), 和 Herman et al. J. Immunological Methods, 285 (1) : 25-40 (2004) 中描述的细胞毒性测定。在某些实施方式中,通过测定一种或多种细胞因子(如CD 107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达

和/或分泌来测量细胞的生物活性。在一些方面中,生物活性是通过评估临床结局,如肿瘤负担或负荷的减少来衡量的。

[0358] 在某些实施方式中,对象被提供二级治疗(secondary treatment)。二级治疗包括但不限于化疗、放疗、手术和药物。

[0359] 在一些实施方式中,可以在CAR T细胞疗法之前施用给对象调理疗法(conditioning therapy)。在一些实施方式中,调理疗法包括向对象施用有效量的环磷酰胺。在一些实施方式中,调理疗法包括向对象施用有效量的氟达拉滨。在优选的实施方式中,调理疗法包括向对象施用有效量的环磷酰胺和氟达拉滨的组合。在CAR T细胞疗法之前施用调理疗法可提高CAR T细胞疗法的功效。美国专利号9,855,298(其通过引用以其整体并入本文)中描述了针对T细胞疗法对患者进行调理的方法。

[0360] 在一些实施方式中,本公开的具体剂量方案包括在施用修饰的T细胞之前的淋巴细胞耗竭步骤(lymphodepletion step)。在示例性实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括环磷酰胺和/或氟达拉滨的施用。

[0361] 在一些实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括以约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $2000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间(例如, $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)的剂量施用环磷酰胺。在示例性实施方式中,环磷酰胺的剂量是约 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。在一些实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括以约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间(例如, $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)的剂量施用氟达拉滨。在示例性实施方式中,氟达拉滨的剂量是约 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。

[0362] 在一些实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括以约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $2000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间(例如, $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)的剂量施用环磷酰胺,和以约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间(例如, $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)的剂量施用氟达拉滨。在示例性实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括以约 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的剂量施用环磷酰胺,和以约 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的剂量施用氟达拉滨。

[0363] 在示例性实施方式中,环磷酰胺的给药是三天内 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,而氟达拉滨的给药是三天内 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 。

[0364] 相对于在第0天输注T细胞(例如,CAR-T、TCR-T、修饰的T细胞等),在第-6天至第-4天安排淋巴细胞耗竭化疗的给药(窗口为-1天,即,在第-7天至第-5天给药)。

[0365] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象在施用修饰的T细胞前接受包括静脉内输注3天 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 环磷酰胺的淋巴细胞耗竭化疗。在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象在施用修饰的T细胞前接受包括静脉内输注3天 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 环磷酰胺的淋巴细胞耗竭化疗。

[0366] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象接受淋巴细胞耗竭化疗,淋巴细胞耗竭化疗包括剂量为约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间(例如, $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)的氟达拉滨。在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象接受包括剂量为 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 氟达拉滨达3天的淋巴细胞耗竭化疗。

[0367] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象接受淋巴细胞耗竭化疗,淋巴细胞耗竭化疗包括剂量为约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $2000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间(例如, $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)的环磷酰胺,和剂量为约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间(例如, $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)的氟达拉滨。在示例性实施方式中,

对于患有癌症的对象,该对象接受淋巴细胞耗竭化疗,淋巴细胞耗竭化疗包括剂量为约300mg/m²/天的环磷酰胺和剂量为30mg/m²的氟达拉滨达3天。

[0368] 本发明的细胞可按剂量和途径施用,并且有时在适当的临床前与临床实验和试验中确定。细胞组合物可按在这些范围内的剂量多次施用。本发明的细胞的施用可与可用于治疗由本领域技术人员所确定的需的疾病或状况的其它方法组合。

[0369] 本领域已知,输注CAR T细胞后的不良效果之一是免疫激活的开始,免疫激活的开始被称为细胞因子释放综合征(CRS)。CRS是导致炎症细胞因子升高的免疫激活。CRS是一种已知的中靶毒性(on-target toxicity),其发展可能与功效相关。临床测量和实验室测量的范围从轻度CRS(全身症状和/或2级器官毒性)到严重CRS(sCRS;3级以上的器官毒性、攻击性临床干预和/或潜在的生命威胁)。临床特征包括:高热、不适、疲劳、肌痛、恶心、厌食、心动过速/低血压、毛细血管渗漏、心功能障碍、肾功能损害、肝功能衰竭和弥散性血管内凝血。CAR T-细胞输注后,细胞因子包括干扰素- γ 、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、IL-10和IL-6显示出显著升高。一种CRS特征是细胞因子包括IL-6(严重升高)、IFN- γ 、TNF- α (中度)和IL-2(轻度)的升高。还观察到包括铁蛋白和C-反应蛋白(CRP)在内的临床上可用的炎症标志物的升高与CRS综合征相关。CRS的存在通常与过继转移的细胞的扩大和进行性免疫激活有关。已经证明,CRS的严重程度取决于输注时的疾病负担,因为肿瘤负担重的患者经历更多的sCRS。

[0370] 因此,本发明提供在CRS诊断之后适当的CRS管理策略以减轻不受控制的炎症的生理症状,而不减少工程改造的细胞(例如,CAR T细胞)的抗肿瘤功效。CRS管理策略是本领域已知的。例如,可施用全身性皮质类固醇以快速逆转sCRS(例如,3级CRS)的症状,而不损害初始抗肿瘤反应。

[0371] 在一些实施方式中,可施用抗IL-6R抗体。抗IL-6R抗体的实例是食品和药品监督管理局批准的单克隆抗体托珠单抗(tocilizumab),也称为atlizumab(市场上称为Actemra或RoActemra)。托珠单抗是一种针对白介素-6受体(IL-6R)的人源化单克隆抗体。托珠单抗的施用已证明CRS几乎立即被逆转。

[0372] CRS通常根据观察到的综合征的严重程度进行管理,并为此量身定制干预措施。CRS管理决策可能基于临床体征和症状以及对干预措施的反应,而不仅仅是实验室值。

[0373] 轻中度病例一般采用充分缓解症状所需的流体疗法、非甾体抗炎药(NSAID)和抗组胺剂进行症状管理。更严重的病例包括任意程度的血液动力学不稳定的患者;患有任意的血液动力学不稳定,建议施用托珠单抗。在一些实施方式中,CRS的一线管理可以是60分钟内IV 8mg/kg的标记剂量(不超过800mg/剂量)的托珠单抗;托珠单抗可重复Q8小时。如果对第一剂量的托珠单抗反应不理想,可以考虑额外剂量的托珠单抗。托珠单抗可单独施用,也可与皮质类固醇疗法联用。持续性或进行性CRS症状、12-18小时内临床改善不足或对托珠单抗反应差的患者可采用大剂量皮质类固醇疗法进行治疗,一般IV氢化可的松100mg或甲泼尼龙1-2mg/kg。对于血液动力学不稳定或呼吸症状较严重的患者,可在CRS早期施用大剂量皮质类固醇疗法。CRS管理指南可基于已发布的标准(Lee et al. (2019) Biol Blood Marrow Transplant, doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.758; Neelapu et al. (2018) Nat Rev Clin Oncology, 15:47; Teachey et al. (2016) Cancer Discov, 6(6):664-679)。

[0374] 在用CAR-T疗法治疗的患者中观察到与巨噬细胞激活综合征(MAS)或噬血细胞性

淋巴组织细胞增多症 (HLH) 一致的特征 (Henter, 2007), 与 CRS 的临床表现一致。MAS 似乎是对 CRS 引起的免疫激活的反应, 因此应被视为 CRS 的一种表现。MAS 类似于 HLH (也是对免疫刺激的反应)。MAS 的临床综合征的特征在于高等级的非缓解性发热、影响三个谱系中至少两个谱系的细胞减少以及肝脾大。它与高血清铁蛋白、可溶性白介素-2 受体和甘油三酯以及循环的自然杀伤 (NK) 活性的降低有关。

[0375] 一方面, 本发明包括治疗对其有需要的对象中的癌症的方法, 包括向对象施用本文公开的任一种修饰的免疫细胞或前体细胞。本发明的又一方面包括治疗对其有需要的对象中的癌症的方法, 包括向对象施用由本文公开的任一种方法产生的修饰的免疫细胞或前体细胞。

[0376] F. 免疫细胞的来源

[0377] 在某些实施方式中, 从对象获得免疫细胞 (例如, T 细胞) 的来源以供离体操纵。供离体操纵的靶细胞的来源还可包括, 例如, 自体或异源供体血液、脐带血或骨髓。例如, 免疫细胞的来源可来自待用本发明的修饰的免疫细胞处理的对象, 例如, 对象的血液、对象的脐带血或对象的骨髓。对象的非限制性实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。优选地, 对象是人。

[0378] 免疫细胞可从多种来源获得, 包括血液、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脾组织、脐带、淋巴或淋巴器官。免疫细胞是免疫系统的细胞, 如先天性免疫或适应性免疫的细胞, 例如, 髓样细胞或淋巴样细胞, 包括淋巴细胞, 一般是 T 细胞和/或 NK 细胞。其它示例性细胞包括干细胞, 如多能干细胞和多潜能干细胞, 包括诱导多潜能干细胞 (iPSC)。在一些方面中, 这些细胞是人细胞。对于待处理的对象, 这些细胞可以是同种异体和/或自体的。这些细胞一般是原代细胞, 诸如那些从对象直接分离和/或从对象分离并冷冻的细胞。

[0379] 在某些实施方式中, 免疫细胞是 T 细胞, 例如, CD8+T 细胞 (例如, CD8+幼稚 T 细胞、中枢记忆 T 细胞或效应记忆 T 细胞)、CD4+T 细胞、自然杀伤 T 细胞 (NKT 细胞)、调节 T 细胞 (Treg)、干细胞记忆 T 细胞、淋巴祖细胞、造血干细胞、自然杀伤细胞 (NK 细胞) 或树枝状细胞。在一些实施方式中, 细胞是单核细胞或粒细胞, 例如, 髓样细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树枝状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。在一个实施方式中, 靶细胞是诱导多潜能干 (iPS) 细胞或源自 iPS 细胞的细胞, 例如, 从对象产生的 iPS 细胞, 经操纵以改变 (例如, 诱导一个或多个靶基因的突变) 或操纵一个或多个靶基因的表达, 并分化成例如 T 细胞, 例如 CD8+T 细胞 (例如, CD8+幼稚 T 细胞、中枢记忆 T 细胞或效应记忆 T 细胞)、CD4+T 细胞、干细胞记忆 T 细胞、淋巴祖细胞或造血干细胞。

[0380] 在一些实施方式中, 细胞包括一个或多个 T 细胞亚群或其它细胞类型, 如整个 T 细胞群、CD4+细胞、CD8+细胞及其亚群, 如由功能、激活状态、成熟度、分化潜能、扩大、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或隔室中的存在、标记物或细胞因子分泌分布 (profile) 和/或分化程度所定义的那些。在 T 细胞和/或 CD4+T 细胞和/或 CD8+T 细胞的亚型和亚群中的是幼稚 T (TN) 细胞、效应 T 细胞 (TEFF)、记忆 T 细胞及其亚型, 如干细胞记忆 T 细胞 (TSCM)、中枢记忆 T 细胞 (TCM)、效应记忆 T (TEM) 或终末分化效应记忆 T 细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)、未成熟 T 细胞、成熟 T 细胞、辅助性 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、粘膜相关恒定 T (MAIT) 细胞、天然存在的和适应性调节 T (Treg) 细胞、辅助性 T 细胞, 如 TH1 细胞、TH2 细胞、TH3 细胞、TH17 细胞、TH9 细胞、TH22 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、 α/β T 细胞和 δ/γ T

细胞。在某些实施方式中,可以使用本领域中可获得的任意数量的T细胞系。

[0381] 在一些实施方式中,方法包括从对象分离免疫细胞,对其制备、处理、培养和/或工程改造。在一些实施方式中,工程改造的细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。用于工程改造的细胞可从样品(如生物样品,例如,获自或源自对象的生物样品)中分离。在一些实施方式中,从中分离细胞的对象是患有疾病或状况或需要细胞疗法或将要对其施用细胞疗法的对象。在一些实施方式中,对象是需要特定治疗干预(诸如细胞进行分离、处理和/或工程改造的过继性细胞疗法)的人。因此,一些实施方式中的细胞是原代细胞,例如,原代人细胞。样品包括组织、流体和直接取自对象的其它样品,以及得自一个或多个处理步骤,如分离、离心、基因工程改造(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或温育的样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品,或者是经过处理的样品。生物样品包括但不限于体液,如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液、组织和器官样品,包括源自其中的经处理的样品。

[0382] 在一些方面中,细胞所源自或分离的样品是血液样品或源自血液的样品,或是单采血液成分术产物或白细胞提取法产物,或者源自单采血液成分术产物或白细胞提取法产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其它淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳腺、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其它器官和/或源自其的细胞。在细胞疗法(例如,过继性细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体来源和同种异体来源的样品。在某些实施方式中,修饰的免疫细胞源自患者的外周血单核细胞(PBMC)。因此,在一些实施方式中,PBMC包括肿瘤细胞。

[0383] 在一些实施方式中,细胞源自细胞系,例如T细胞系。一些实施方式中的细胞来自异种来源,例如来自小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪。在一些实施方式中,细胞的分离包括一个或多个制备步骤和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些实例中,细胞在一种或多种试剂的存在下被洗涤、离心和/或温育,从而例如去除不需要的组分、富集所需的组分、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些实例中,基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、大小、敏感性和/或对特定组分的抗性)分离细胞。

[0384] 在一些实例中,例如通过单采血液成分术或白细胞提取法从对象的循环血液中获得细胞。在一些方面中,样品含有淋巴细胞,淋巴细胞包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面中包含除红细胞和血小板之外的细胞。在一些实施方式中,洗涤从对象收集的血细胞,从而例如去除血浆部分并将细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于后续处理步骤。在一些实施方式中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些方面中,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)来完成洗涤步骤。在一些实施方式中,细胞在洗涤后重悬于多种生物相容性缓冲液中。在某些实施方式中,去除血细胞样品的组分并且将细胞直接重悬于培养基中。在一些实施方式中,方法包括基于密度的细胞分离方法,诸如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心从外周血制备白细胞。

[0385] 在一个实施方式中,通过单采血液成分术或白细胞提取法获得来自个体的循环血液的免疫细胞。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。可洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以去除血浆

部分并将细胞置于适当的缓冲液或介质如磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中,或洗涤溶液缺乏钙并且可能缺乏镁或可能缺乏许多(甚至所有的)二价阳离子以用于后续处理步骤。洗涤后,细胞可重悬于多种生物相容性缓冲液中,诸如,例如无钙无镁的PBS。可选地,可以去除单采血液成分术样品的不需的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0386] 在一些实施方式中,分离方法包括基于一种或多种特异性分子,如表面标记物(例如,表面蛋白)、胞内标记物或核酸在细胞中的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方式中,可以使用基于这些标记物的任意已知的分离方法。在一些实施方式中,分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面中,分离包括基于细胞的表达或一种或多种标记物(通常是细胞表面标记物)的表达水平对细胞和细胞群进行的分离,例如,通过与特异性地结合到这种标记物的抗体或结合配偶体温育,之后大体上是洗涤步骤和将结合了抗体或结合配偶体的细胞与未结合该抗体或结合配偶体的细胞分离。

[0387] 这种分离步骤可以基于阳性选择,其中保留已结合试剂的细胞以供进一步使用;和/或基于阴性选择,其中保留未结合抗体或结合配偶体的细胞。在一些实例中,这两部分都被保留以供进一步使用。在一些方面中,阴性选择在没有可用于在异种群体中特异性地识别细胞类型的抗体的情况下会特别有用,使得基于由除了所需群体之外的细胞所表达的标记物进行分离是最佳的。分离无需导致特定细胞群或表达特定标记物的细胞的100%富集或去除。例如,对特定类型的细胞(诸如表达标记物的细胞)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不必导致不表达该标记物的细胞的完全缺失。同样地,特定类型细胞(诸如表达标记物的细胞)的阴性选择、去除或耗竭是指减少此类细胞的数量或百分比,但不必导致完全去除所有此类细胞。

[0388] 在一些实例中,进行多轮分离步骤,其中从一个步骤经阳性选择或阴性选择的步骤经历另一分离步骤,诸如后续的阳性选择或阴性选择。在一些实例中,单个分离步骤可同时耗竭表达多个标记物的细胞,诸如通过将细胞与多个抗体或结合配偶体温育,每个抗体或结合配偶体都对阴性选择所靶向的标记物具有特异性。同样地,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多个抗体或结合配偶体温育,可以同时阳性选择出多种细胞类型。

[0389] 在一些实施方式中,针对对一个或多个特定标记物(如表面标记物)呈阳性(标记物⁺)或表达高水平(标记物^高)的细胞来富集T细胞群中的一个或多个或使其从上述细胞中耗竭,或针对对一个或多个标记物呈阴性(标记物⁻)或表达低水平(标记物^低)的细胞来富集T细胞群中的一个或多个或使其从上述细胞中耗竭。例如,在一些方面中,通过阳性选择技术或阴性选择技术分离T细胞的特异性亚群,诸如呈阳性的或表达高水平的一个或多个表面标记物的细胞,例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞。在一些情况下,此类标记物是在某些T细胞群(如非记忆细胞)上缺失或以相对较低水平表达,但在某些其它T细胞群(如记忆细胞)上存在或以相对较高水平表达的标记物。在一个实施方式中,针对呈阳性的或表达高表面水平CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127和/或CD62L的细胞来富集(即,阳性选择)细胞(如CD8⁺细胞或T细胞,例如,CD3⁺细胞)和/或使其从呈阳性的或表达高表面水平CD45RA的细胞中耗竭(例如,阴性选择)。在一些实施方式中,针对呈阳性的或表达高表面水平CD122、CD95、CD25、CD27和/或IL7-Ra (CD127)的细胞来富集细胞或使其从上述细胞中耗竭。在一些实例中,针对对CD45RO呈阳性(或对CD45RA呈阴性)且对CD62L呈阳性的细胞来富集CD8⁺T细胞。例如,可以使用CD3/CD28缀合磁

珠(例如, DYNABEADS®M-450CD3/CD28T Cell Expander)阳性选择CD3⁺, CD28⁺T细胞。

[0390] 在一些实施方式中,通过非T细胞(如B细胞、单核细胞或其它白细胞)上表达的标记物(如CD14)的阴性选择,从PBMC样品中分离T细胞。在一些方面中,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过对在一个或多个幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或表达达到相对较高程度的标记物进行阳性选择或阴性选择,可将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类为亚群。在一些实施方式中,通过基于与相应亚群相关联的表面抗原的阳性选择或阴性选择,针对幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞来进一步富集CD8⁺细胞或使其从上述细胞中耗竭。在一些实施方式中,对中枢记忆T (TCM) 细胞进行富集以提高功效,从而在施用后诸如提高长期存活、扩大和/或移入,这在某些方面在此类亚群中是尤其稳健的(robust)。在一些实施方式中,将富集TCM的CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞组合,进一步增强了功效。

[0391] 在一些实施方式中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚群中。可诸如使用抗CD8抗体和抗CD62L抗体,针对CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺部分来富集PBMC或将其从上述部分中耗竭。在一些实施方式中,CD4⁺T细胞群和CD8⁺T细胞亚群,例如,是针对中枢记忆T (TCM) 细胞富集的亚群。在一些实施方式中,对中枢记忆T (TCM) 细胞的富集基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD127的阳性或高表面表达;在一些方面中,其基于对表达或高表达CD45RA和/或粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面中,通过耗竭表达CD4、CD14、CD45RA的细胞和对表达CD62L的细胞阳性选择或富集来进行针对TCM细胞富集的CD8⁺群体的分离。一方面,对中枢记忆T (TCM) 细胞进行的富集以基于CD4表达所选择的细胞的阴性部分开始,该阴性部分经历基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择,并且经历基于CD62L的阳性选择。在一些方面中,这种选择是同时进行的,而在其它方面中,是以任一顺序按顺序进行的。在一些方面中,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性部分和阴性部分都得以保留,并且任选地在一个或多个其它阳性选择或阴性向选择步骤之后用于方法的后续步骤中。

[0392] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4⁺T辅助细胞分类为幼稚细胞、中枢记忆细胞和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方式中,幼稚CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45RO⁺。在一些实施方式中,效应CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45RO⁻。在一个实例中,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方式中,抗体或结合配偶体结合到固体载体或基质,如磁珠或顺磁珠,以允许分离供阳性选择和/或阴性选择的细胞。

[0393] 在一些实施方式中,细胞在基因工程改造之前或与之相关时被温育和/或培养。温育步骤可以包括培养(culture)、培养(cultivation)、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方式中,在刺激条件或刺激剂存在下温育组合物或细胞。这种条件包括那些被设计用于诱导细胞在群体中增殖、扩大、激活和/或存活以模拟抗原暴露,和/或为基因工程改造(诸如为导入重组抗原受体)准备(prime)细胞的条件。这些条件可包括以下中的一项或多项:特定的培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、剂,例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体)以及被设

计以使细胞激活的任意其它剂。在一些实施方式中,刺激条件或剂包括一种或多种剂,例如,配体,其能够激活TCR复合体的胞内信号传导结构域。在一些方面中,该剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3胞内信号传导级联。此类剂可包括抗体,诸如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的抗体,例如,例如结合到固体载体(诸如珠)的抗CD3、抗CD28,和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩大方法可进一步包含向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)。在一些实施方式中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,至少约10单位/mL的IL-2浓度。

[0394] 在另一实施方式中,通过裂解红细胞并耗竭单核细胞,例如通过PERCOLL™梯度离心将T细胞从外周血中分离出来。可选地,T细胞可以从脐带中分离出来。在任何情况下,特定的T细胞亚群都可以通过阳性选择技术或阴性选择技术进一步分离。

[0395] 可以从表达某些抗原,包括但不限于CD34、CD8、CD14、CD19和CD56的细胞中耗竭如此分离的脐带血单核细胞。可使用分离的抗体、包含抗体的生物样品(如腹水)、结合物理载体的抗体以及细胞结合抗体来完成对这些细胞的耗竭。

[0396] 通过阴性选择富集T细胞群可使用针对以阴性方式选择的细胞所特有的表面标记物的抗体的组合来实现。优选方法是通过使用针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标记物的单克隆抗体混合物的阴性磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。

[0397] 为了通过阳性选择或阴性选择来分离所需的细胞群,可以改变细胞的浓度和表面(例如,颗粒,如珠)。在某些实施方式中,可能会需要显著减少珠和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一个实施方式中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方式中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在其它实施方式中,使用大于1亿个细胞/ml。在其它实施方式中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一实施方式中,使用7500、8000、8500、9000、9500万个或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在其它实施方式中,可使用1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致细胞产量增加、细胞激活和细胞扩大。

[0398] T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻,不需要去除单核细胞的步骤。虽然不希望受到理论的束缚,但冷冻和随后的解冻步骤通过去除细胞群中的粒细胞和在某种程度上去除单核细胞提供了更为均一的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,细胞可以悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的并且在此背景下将是有用的,但在非限制性实例中,一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或其它合适的细胞冷冻介质。然后以每分钟1℃的速率将细胞冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的汽相中。可使用受控冷冻的其它方法,也可在-20℃下或在液氮中立即进行非受控冷冻。

[0399] 在一个实施方式中,T细胞群包括在诸如外周血单核细胞、脐带血细胞、纯化的T细胞群和T细胞系的细胞内。在另一实施方式中,外周血单核细胞包括T细胞群。在又一实施方式中,纯化的T细胞包括T细胞群。

[0400] 在某些实施方式中,可从样品中分离T调节细胞(Treg)。样品可包括但不限于脐带血或外周血。在某些实施方式中,通过流式细胞术分选分离Treg。在分离之前,可通过本领域已知的任何手段对样品进行Treg富集。可将分离的Treg冷冻保存,和/或在使用前扩大。

分离Treg的方法在美国专利号7,754,482、8,722,400和9,555,105以及美国专利申请号13/639,927(其内容以其整体并入本文中)中有描述。

[0401] G.免疫细胞的扩大

[0402] 不管是在对细胞进行修饰以表达CAR之前还是之后,都可以使用例如在美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国公开号20060121005中描述的方法使细胞激活并在数量上扩大细胞。例如,本发明的T细胞可通过接触附着了刺激CD3/TCR复合体相关信号的剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面来扩大。具体而言,T细胞群可通过接触抗CD3抗体或其抗原结合片段,或固定在表面上的抗CD2抗体,或通过与结合钙离子载体的蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑制素)接触来刺激。为了对T细胞表面的辅助分子进行共刺激,使用结合辅助分子的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,T细胞可与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone,Besancon,法国),并且这些可如本领域已知的其它方法和试剂那样在本发明中使用(参见,例如,ten Berge et al., Transplant Proc. (1998) 30 (8):3975-3977;Haanen et al., J. Exp. Med. (1999) 190 (9):1319-1328;和Garland et al., J. Immunol. Methods (1999) 227 (1-2):53-63)。

[0403] 通过本文公开的方法扩大T细胞可乘以约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍或更大,以及在其之间的任意和全部或部分整数。在一个实施方式中,T细胞在约20倍至约50倍的范围内扩大。

[0404] 培养后,T细胞可在培养设备中的细胞培养基中温育一段时间,或直到细胞达到汇合(confluency)或高细胞密度以供最佳传代,之后再将细胞送至另一培养设备。培养设备可以是常用于体外培养细胞的任何培养设备。优选地,在将细胞送至另一培养设备之前,汇合水平为70%或更高。更优选地,汇合水平为90%或更高。一段时间可以是适合细胞体外培养的任何时间。在T细胞培养过程中,可随时更换T细胞培养基。优选地,大约每2到3天更换一次T细胞培养基。然后从培养设备中获取T细胞,随之可立即使用T细胞或将其冷冻保存以供后期使用。在一个实施方式中,本发明包括冷冻保存经扩大的T细胞。在将核酸导入T细胞之前使冷冻保存的T细胞解冻。

[0405] 在另一实施方式中,方法包括分离T细胞和扩大T细胞。在另一实施方式中,本发明还包括在扩大之前冷冻保存T细胞。在又一实施方式中,将冷冻保存的T细胞解冻以用编码嵌合膜蛋白的RNA进行电穿孔。

[0406] 另一种离体扩大细胞的程序在美国专利号5,199,942(通过引用并入本文)中描述。扩大,如美国专利号5,199,942中描述的,可以是本文所述其它扩大方法的替代方案或除此之外的其它方法。简而言之,T细胞的离体培养和扩大包括添加细胞生长因子(如美国专利号5,199,942中描述的细胞生长因子)或其它因子(如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体)。在一个实施方式中,扩大T细胞包括用选自flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体的因子来培养T细胞。

[0407] 如本文所述的培养步骤(如本文所述与剂接触或在电穿孔后)可以非常短暂,例如

小于24小时,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时。如本文进一步所述的培养步骤(如本文所述与剂接触)可以更长,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天。

[0408] 各种术语被用来描述培养中的细胞。细胞培养通常是指从活生物体中取出并在受控条件下生长的细胞。原代细胞培养是在第一次继代培养之前,直接从生物体中取出的细胞、组织或器官的培养。当细胞被置于促进细胞生长和/或分裂的条件下的生长培养基中时,细胞在培养中扩大,从而产生更大的细胞群。当细胞在培养中扩大时,细胞增殖的速率通常是通过细胞数量加倍所需的时间来衡量的,也就是所谓的加倍时间。

[0409] 每一轮继代培养都被称为一次传代。当细胞进行继代培养时,它们被称为已经传代。特定的细胞群或细胞系有时指代其已传代的次数或以其已传代的次数为特征。例如,传代十次的所培养的细胞群可被称为P10培养。原代培养,即从组织中分离细胞后的第一次培养,称为P0。第一次继代培养后,细胞被描述为是次代培养(P1或第1代)。第二次继代培养后,细胞变成第三代培养(P2或第2代),依此类推。本领域技术人员将理解,在传代期间可能存在多种群体加倍;因此培养物的群体加倍数大于传代数。传代期间细胞的扩大(即,群体加倍数)取决于许多因素,包括但不限于接种密度、底物、培养基和传代间隔时间。

[0410] 在一个实施方式中,细胞可培养数小时(约3小时)至约14天或其间的任意小时整数值。适合T细胞培养的条件包括适合的培养基(例如,极限必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15, (Lonza)),其可包含增殖和存活所必需的因子,包括血清(例如,胎牛血清或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β 和TNF- α ,或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任意其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白制剂(plasmanate)和还原剂如N-乙酰半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimzer,添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充适量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或足以使T细胞生长和扩大的量的细胞因子(一种或多种)。抗生素(例如,青霉素和链霉素)只包含在实验培养物中,而不包含在待输注到对象体内的细胞培养物中。靶细胞维持和支持生长所需的条件下,例如,适当的温度(例如,37°C)和大气(例如,空气加5%的二氧化碳)。

[0411] 用于培养T细胞的培养基可包括可共同刺激T细胞的剂。例如,能够刺激CD3的剂是针对CD3的抗体,而能够刺激CD28的剂是针对CD28的抗体。通过本文公开的方法分离的细胞可扩大约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍或更大。在一个实施方式中,T细胞在约20倍至约50倍或更大的范围内扩大。在一个实施方式中,通过抗CD3抗体包被的KT64.86人工抗原呈递细胞(aAPC)来扩大人T调节细胞。用于使T细胞扩大和激活的方法可在美国专利号7,754,482、8,722,400和9,555,105(其内容以其整体并入本文)中找到。

[0412] 在一个实施方式中,扩大T细胞的方法可进一步包括分离扩大的T细胞以供进一步应用。在另一实施方式中,扩大的方法可进一步包括随后对扩大的T细胞进行电穿孔,之后进行培养。随后的电穿孔可包括向扩大的T细胞群中导入编码剂的核酸,诸如用核酸对扩大

的T细胞转导、对扩大的T细胞转染或对扩大的T细胞电穿孔,其中剂进一步刺激T细胞。剂可刺激T细胞(诸如通过刺激进一步的扩大)、效应物功能或其它T细胞功能。

[0413] H. 药物组合物和制剂

[0414] 本发明还提供本发明的免疫细胞群、含有这样的细胞和/或富集这样的细胞的组合,诸如其中表达CAR的细胞占组合中总细胞或某种类型的细胞如T细胞或CD8⁺或CD4⁺细胞至少50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。在组合物当中的是用于施用以诸如用于过继性细胞疗法的药物组合物和制剂。还提供用于向对象(例如,患者)施用细胞和组合物的治疗方法。

[0415] 还提供包括用于施用的细胞的组合物,该组合物包括药物组合物和制剂,如单位剂型组合物,单位剂型组合物包括以给定剂量或其部分来施用的细胞的数量。药物组合物和制剂通常包括一种或多种任选的药理学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方式中,组合物包括至少一种其它治疗剂。

[0416] 术语“药物制剂”是指这样的制剂:这种形式的该制剂允许其中所含活性成分的生物活性有效且不含有对将施用该制剂的对象具有不可接受的毒性的其它成分。“药理学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分外,对于对象无毒的成分。药理学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。在一些方面中,载体的选择部分地由特定细胞和/或施用方法确定。因此,存在多种合适的制剂。例如,药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可包括,例如,羟苯甲酯、羟苯丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面中,使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。例如,Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. Ed. (1980)对载体进行了描述。所采用的剂量和浓度下的药理学上可接受的载体通常对接受者是无毒的,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯类,如羟苯甲酯或羟苯丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0417] 在一些方面中,缓冲剂包括在组合物中。合适的缓冲剂包括,例如,柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其它酸和盐。在一些方面中,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。制备可施用的药物组合物的方法是已知的。示例性方法在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (2005年5月1日)中有更详细的描述。

[0418] 制剂可包括水溶液。制剂或组合物还可包含多于一种的活性成分,活性成分可用于用细胞治疗的特定适应症、疾病或状况,优选活性与该细胞互补的活性成分,其中各自的活性彼此不产生不利影响。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。因此,在一些实施方式中,药物组合物进一步包括其它药理学活性剂或药物,如化疗剂,例如天门冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、

甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春花碱和/或长春新碱。在一些实施方式中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或状况的量(如治疗有效或预防有效量)的细胞。在一些实施方式中,通过对所治疗的对象周期性评估来监测治疗或预防功效。所需的剂量可通过细胞的单次弹丸施用、细胞的多次弹丸施用,或通过细胞的连续输注施用来递送。

[0419] 制剂包括口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺部、经皮、肌内、鼻内、口腔(buccal)、舌下或栓剂施用的制剂。在一些实施方式中,肠胃外施用细胞群。如本文所用,术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方式中,利用外周全身性递送,通过静脉内注射、腹膜内注射或皮下注射将细胞施用于对象。在一些实施方式中,组合物作为无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物,其在某些方面可缓冲至选定的pH值。液体制剂通常比凝胶、其它粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物更便于施用,尤其是通过注射。另一方面,粘性组合物可在适当的粘度范围内配制以提供与特定组织的较长接触时间。液体组合物或粘性组合物可包含载体,其可以是溶剂或分散介质,溶剂或分散介质含有,例如,水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0420] 无菌可注射溶液可通过将细胞并入溶剂中制备,诸如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。组合物可包含辅助物质,如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、凝胶或粘性增强添加剂、防腐剂、调味剂和/或色素,这取决于施用途和所需的制剂。在某些方面可以参考标准文本来制备合适的制剂。

[0421] 可以添加各种增强组合物的稳定性和无菌性的添加剂,包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。各种抗菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚和山梨酸可以确保对微生物作用的预防。通过使用延迟吸收的剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)可延长可注射药物形式的吸收。

[0422] 待用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌性可以很容易地实现,例如通过无菌过滤膜来过滤。

[0423] 本文提到或引用的文章、专利和专利申请以及所有其它文件和可以电子方式获得的信息的内容特此通过引用以其整体并入,其程度与所指示通过引用将每一个独立的出版物具体且独立地并入一样。申请人保留将来自任何此类文章、专利、专利申请或其它实体和电子文件中的任何以及所有材料和信息实体并入本申请的权利。

[0424] 尽管已经参考其具体实施方式描述了本发明,但是本领域技术人员应该理解,在不背离本发明的真实精神和范围的情况下,可以做出各种改变和等同物替换。对于本领域技术人员而言将显而易见的是,在不脱离本文所公开的实施方案的范围的情况下,可以使用合适的等同物对本文描述的方法进行其它合适的修改和改编。另外,可以做出多种修改以使特定情况、材料、物质组成、方法、一个或多个方法步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改都旨在落入所附权利要求的范围内。现在已经详细描述了某些实施方式,通过参考以下实例将会对其更清楚地了解,这些实施方式仅出于说明的目的被包括在内而不旨在限制。

[0425] 实验实施例

[0426] 现在参考以下实施例描述本发明。提供这些实施例仅仅是为了说明的目的,并且

本发明不限于这些实施例,而是涵盖由于本文提供的教导而显而易见的所有变型。

[0427] 材料与方法

[0428] CCR4-CAR T细胞的产生:从4种抗CCR4 mAb构建8种抗CCR4 scFv。每个重链可变区(H)和轻链可变区(L)通过4次重复的连接体以H至L或L至H方向融合(表2)。将scFv克隆到含有4-1BB和CD3ζ的第二代主链CAR中(补充图S1A)。如前所述构建含有4-1BB和CD3ζ的对照CD19-CAR(Milone MC,et al.Mol Ther.2009;17(8):1453-1464.)。来自正常供体的T细胞用抗CD3/28珠刺激,以4的感染复数(MOI)用慢病毒转导CAR,并在不补充任何细胞因子的情况下扩大。

[0429] 表2:CCR4-CAR及其来源的原始mAbs的列表

[0430]	#	CAR	scFv	mAb 克隆	亲和力(Kd)	CCR4 表位	序列来源
	1	KW_H2L	H 至 L	KW-0761	ND (缓慢解离)	NT 12 至 29 (DESIYSNYYLYESIPKPC)	WO2015179236A1
	2	KW_L2H	L 至 H				
	3	1-49_H2L	H 至 L	mAb 1-49	77.98 nM	ND (NT 与 ECL 组合)	WO2013166500A1
	4	1-49_L2H	L 至 H				
	5	2-3_H2L	H 至	mAb 2-3	1.39 nM		
[0431]			L				
	6	2-3_L2H	L 至 H				
	7	h1567_H2L	H 至 L	h1567	2.54 nM		
	8	h1567_L2H	L 至 H				

[0432] NT,N-末端;ECL,胞外环(extracellular loop);ND,未确定;Kd值来自抗体数据,而非scFv数据。

[0433] 细胞系:T细胞淋巴瘤衍生的细胞系HH(ATCC CRL-2105)、MJ(ATCC CRL-8294)和HuT78(ATCC TIB-161)获自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。B-ALL衍生的细胞系即Nalm6由宾夕法尼亚大学的Joseph AFraietta赠送。用慢病毒转导细胞系以表达叩甲虫荧光素酶绿色(click beetle luciferase green)和GFP(CBG-GFP)。HH细胞被进一步转导以表达截短的CD19(HH-CBG-GFP-t19),然后通过INFLUX细胞分选器(BD Biosciences)分选用于纯化。为了模拟CCR4和CAR双阳性T细胞群,使用与用于正常T细胞转导相同的慢病毒对HH细胞转导CCR4(KW_L2H)-CAR或CCR4(h1567_L2H)-CAR;分别是HH-CCR4(KW_L2H)CAR和HHCCR4(h1567_L2H)CAR。所有细胞系均经亚利桑那大学Genetics Core证实为真并且检测是否存在支原体污染(MycoAlert支原体检测试剂盒,Lonza)。HH和

Nalm6用补充10%胎牛血清(FBS)(Seradigm)的RPMI(Gibco,Life Technologies)维持培养,而MJ和HuT78用补充20%FBS的IMDM(Gibco,Life Technologies)维持培养。

[0434] 基于萤光素酶的杀伤测定:将CAR T细胞和表达萤光素酶的 1×10^4 靶细胞在圆底96孔板(Costar)中以指示的效应物靶比(E:T比)共培养。加入Triton X-100进行总裂解对照。共培养16小时后,用PBS洗涤细胞并用100ul萤光素酶细胞培养物裂解缓冲液(Promega)裂解,然后进行一个周期的冷冻和解冻以获得完全裂解。利用萤光素酶测定系统(Luciferase Assay System,Promega),通过Synergy H4读板器(BioTek)分析裂解物的萤光素酶活性。使用以下公式计算特异性裂解百分比;%特异性裂解=[(实验裂解-自发裂解)/(最大裂解-自发裂解)] $\times$ 100。

[0435] ^{51}Cr 释放测定:用 ^{51}Cr (PerkinElmer)标记靶细胞2小时并用RPMI培养基洗涤两次。将CAR T细胞和 1×10^4 个标记的细胞在96孔圆底板中以指示的E:T比共培养4小时。加入十二烷基硫酸钠(SDS)进行总细胞裂解对照。将每个孔的上清液转移至LumaPlate-96(PerkinElmer)并使用TopCount读板器(PerkinElmer)将 ^{51}Cr 发出的辐射量测定为每分钟计数(CPM)。使用以下公式计算特异性裂解百分比;%特异性裂解=[(实验cpm-自发cpm)/(最大cpm-自发cpm)] $\times$ 100。

[0436] 患者样品采集:临床样品(肿瘤)根据机构审查委员会(Institutional Review Board,IRB)批准的方案在宾夕法尼亚大学临床实践中获得。所有对象均根据《赫尔辛基宣言》(Declaration of Helsinki)提供了书面知情同意书。

[0437] 小鼠实验和生物发光成像(BLI):5至7周大的NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠(Jackson Laboratories)静脉内接种HH-CBG-GFP或HH-CBG-GFP-t19,并在肿瘤接种后第7天用0.5或 2×10^6 个CAR阳性T细胞或未转导(UTD)T细胞进行处理。在Xenogen IVIS-200光谱摄像机(Xenogen IVIS-200Spectrum camera,Caliper Life Sciences)中通过BLI跟踪肿瘤负担并用LivingImage软件(PerkinElmer)分析数据。宾夕法尼亚大学实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准了所有动物实验,并根据联邦和实验动物管理和使用委员会的要求,在宾夕法尼亚大学的动物机构中进行了所有动物程序。

[0438] 小鼠外周血分析:通过眶后出血或心脏穿刺获取外周血,并通过FCM使用TruCount管(BD Biosciences)定量每个T细胞亚群的细胞数(总T细胞,CD4,CD8)。按照制造商的说明书(Merck Millipore),使用高灵敏度LUMINEX测定分析血清中的细胞因子。

[0439] 免疫组织化学(IHC):对多聚甲醛固定和石蜡包埋的样品进行IHC染色。从Sigma-Aldrich购买了CCR4特异性抗体(克隆:多克隆,目录号#:HPA031613)。CCL17(EPR15861,ab195044)和CCL22(多克隆,ab9847)特异性抗体购自abcm。染色的载玻片以 $\times 20$ 倍放大倍数扫描。

[0440] 流式细胞术(FCM)分析和抗体:表3中列出了用于FCM分析的抗体。通过用蓝紫色胺反应性活性染料(violet amine-reactive viability dye)LIVE-DEAD蓝紫色(Invitrogen)染色,将死亡细胞门控出来(gated out)。按照制造商的说明书,使用Foxp3/转录因子染色试剂盒(Transcription Factor Staining Kit,Affymetrix)进行细胞内染色。分别通过生物素化抗人Fab抗体和抗小鼠Fab抗体(Jackson ImmunoResearch)检测CCR4-CAR和CD19-CAR的表达。使用Alexa FluorTM680抗体标记试剂盒(Alexa

Fluor™680Antibody Labeling Kit,Thermo Fisher Scientific),将纯化的抗CCR4单克隆抗体(克隆KW-0761)与Alexa Fluor™680缀合。数据由Fortessa LSRII或LSRII细胞计数器(BD Biosciences)采集,并使用FlowJo第10版软件(Tree Star)进行分析。

[0441] 表3:用于FCM和阻断测定的mAb列表

靶标	克隆	荧光染料	制造商	目录号#
CD19	4G7	PE	BD	349209
CD26	BA5b	PE-Cy™5	Biolegend	302708
CD3	OKT3	Briliant Violet 605	Biolegend	317322
CD45	2D1	PerCP-Cy™5.5	Thermo Fisher Scientific	4334219
CD4	OKT4	Briliant Violet 510	Biolegend	317444
CD7	M-T701	BV605	BD	740392
CD7	eBio 124-1D1	PE-Cy™7	eBioscience	25-0079-42
CD8	RPA-T8	APC/Fire750	Biolegend	301066
CCR10	1B5	PerCP-Cy™5.5	BD	564772
CCR4(CD194)	D8SEE	PE	Thermo Fisher Scientific	4346573
CCR4(CD194)	h1567(205410)	PE	R and D	FAB1567P
CCR4(CD194)	KW-0761 (莫格利珠单抗)	纯化的	absolute antibody	Ab00726-23.0
CCR5(CD195)	2D7/CCR5	PE-Cy™7	BD	557752
CCR6(CD196)	G04E3	Briliant Violet 605	Biolegend	353420
CCR7(CD197)	3D12	PE-Cy™7	BD	557648
CXCR3(CD183)	G025H7	Alexa Fluor 488	Biolegend	353710
CD107a	H4A3	PE-Cy™7	Biolegend	328618
CD158k	539304	APC	R and D	FAB2878A
IFN-g	B27	PE-CF594	BD	562392
小鼠 IgG, Fab	na	生物素	Jackson	115-065-072
IgG, Fab	na	生物素	Jackson	109-066-006
IL-2	MQ1-17H12	PerCP-eFluor710	Thermo Fisher Scientific	46-7029-42
TNF-a	MAb11	Briliant Violet 650	Biolegend	502938

[0444] 脱粒和细胞内细胞因子产生测定:在莫能菌素(BD biosciences)和CD107a检测抗体存在的情况下,用对照培养基、佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(phorbol 12-myristate13-acetate)和离子霉素(PMA-Iono)(Sigma-Aldrich)或肿瘤细胞以1:4的反应物:刺激物(responder:stimulator,R:S)比刺激T细胞。共培养6小时时,细胞被染色LIVEDEAD蓝紫色,表面抗原,随后细胞内细胞因子,如在FCM和抗体部分中所描述的。

[0445] 统计学:采用Prism 8(GraphPad Software)进行统计分析。采用双尾学生t检验对这2个组进行比较,以及采用单因素ANOVA,利用Tukey事后检验对3个以上的组进行比较。采用Kaplan-Meier法绘制存活曲线,并用log-rank检验比较2条曲线的差异。p值<0.05视为显

著。

[0446] 实施例1:CCR4是CAR细胞疗法的合理靶点

[0447] 为了确认CCR4是否是CAR细胞疗法的合理靶点,分析了CTCL患者的皮肤病变和源自27个器官的正常组织阵列(TMA)上的CCR4表达(图1和图2)。所有患者的皮肤肿瘤细胞均高表达CCR4,而正常组织中罕有表达CCR4。与临床上抗CCR4 mAb(莫格利珠单抗)疗法的可接受的安全性相符。

[0448] 实施例2:不同scFv的8种抗CCR4-CAR的建立

[0449] 为了产生靶向CCR4的CAR以用于T细胞淋巴瘤和其它癌症的过继性细胞疗法,设计制造(engineered)了一组8个抗CCR4-CAR(CCR4-CAR),每个CCR4-CAR都具有得自人源化抗CCR4单克隆抗体的重(H)和轻(L)结合结构域的不同空间组合;KW-0761(莫格利珠单抗)(Ishii T, et al. Clin Cancer Res. 2010; 16(5):1520-1531)、h1567及其亲和力调节(affinity-tuned)衍生物(Chang DK, et al. Mol Cancer Ther. 2012; 11(11):2451-2461)。将构建的scFv克隆到具有4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的CAR骨架质粒中(表2和图3)。将这一组CCR4-CAR中的CAR转导效率、T细胞扩大和表型与CD19定向CAR(CD19-CAR)对照进行比较。所有形式的CCR4-CAR T细胞均在抗CD3/28珠刺激下扩大,然而,表达KW-0761衍生的scFv的T细胞即CCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T细胞表现出优异的扩大,并产生最高的CAR T细胞产物产率(图4和图5)。在8种类型的CCR4-CAR T细胞中,CCR4(KW_L2H)-CAR T细胞最小(图6),表明活化状态较低。优异的T细胞扩大与高T细胞存活率相关(图7)。与CD19-CAR T细胞和UTD细胞相比,所有CCR4-CAR T细胞均保持分化较低的中枢记忆表型(图8)。有趣的是,在8个CCR4-CAR T细胞产物中的6个当中,观察到不同程度的CAR阳性细胞自动选择。具体地,CCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T细胞在第10天表现出接近100%的CAR表达,尽管转导效率与第2天的其它CCR4-CAR T细胞相当或更低(图9和图10)。

[0450] 实施例3:CCR4(KW_H2L和KW_L2H)-CAR T细胞引发CCR4阳性细胞完全耗竭

[0451] 为了评估T细胞自相残杀是否促成CCR4-CAR T细胞产物中CCR4-CAR T细胞表达的富集,使用抗CCR4单克隆抗体D8SEE(其不与用于CCR4-CAR构建的单克隆抗体的相同表位结合)通过流式细胞术测量CAR T细胞扩大后CAR阳性和阴性群体中CCR4的表达水平(图11)。在所有CAR阴性T细胞群中,CCR4表达迅速丧失并且CD4/8比发生相应的降低(图12、图13和图14)。同样,CCR4(KW_H2L/L2H)-CAR T细胞迅速丧失CCR4表达(图12和图13),表明T细胞自相残杀促成产物中CCR4-CAR阳性T细胞的富集。令人惊讶的是,CCR4(h1567, 1-49)-CAR阳性细胞群对自相残杀相对有抗性;即使在第6天和第10天,CAR阳性群体中仍有大量的CCR4阳性细胞(图12和图13),表明CAR阳性群体中的自相残杀程度取决于抗CCR4 scFv。为了解某些表达表面可检测CCR4的CCR4-CAR T细胞未能杀伤邻近的表达CCR4的CCR4-CAR T细胞——与表达CCR4的CCR4-CAR的T细胞对自相残杀敏感的其它形式不同——的原因,以及为研究CAR阳性T细胞群对自相残杀的抗性机制,用CCR4(KW_L2H)-CAR或CCR4(h1567_L2H)-CAR转导CCR4阳性T细胞系(HH),以模拟CCR4-CAR和CCR4双阳性T细胞群(图15)。假设CCR4(h1567_L2H)-CAR无法杀伤表达CCR4的CCR4(h1567_L2H)-CAR T细胞,因为对CCR4表位的识别被阻断。因此,检测抗CCR4克隆h1567和克隆KW-0761单克隆抗体与表达CCR4(h1567_L2H)-CAR或CCR4(KW_L2H)-CAR的HH细胞的结合。当HH细胞表达CCR4(h1567_L2H)-CAR时,抗CCR4克隆h1567单克隆抗体无法识别CAR T细胞表面上表达的CCR4,但抗CCR4克隆KW-0761

检测到CCR4表面表达。在表达CCR4 (KW_L2H) -CAR的HH细胞中,当使用抗CCR4克隆KW单克隆抗体评估CCR4表达水平时,CCR4检测是降低的(图17)。这些结果表明,CCR4-CAR具体地顺式(in cis)阻断CCR4表位,从而导致对自相残杀的抗性,并指示抗CCR4 scFv与CCR4的顺式结合度是依赖于scFv的。这一现象与之前CD19阳性细胞上CD19-CAR的表达可顺式阻断CD19表位,导致对CAR介导的杀伤产生抗性这一发现是一致的。

[0452] 实施例4:自相残杀改变Th2、Th17和Treg相关细胞因子产生减少的辅助T细胞亚群的比例

[0453] 为了研究CCR4-CAR T细胞自相残杀如何影响CCR4-CAR T细胞产物中CD4⁺T细胞亚群的分布,测量了Th1、Th2、Th17和Treg亚群的水平以及细胞因子分布。观察到与CD19-CAR T细胞相比,CCR4-CAR T细胞产物包括的CD4⁺Th2亚群百分比显著降低,如以下流式细胞术特征所定义的;CD4⁺CCR4⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR10⁻,但维持了CD4⁺Th1亚群的水平;CD4⁺CCR4⁻CXCR3⁺CCR6⁻和CCR10⁻(图17)。由FoxP3和CD25确定的Treg亚群很罕见,并且CD19-CAR T细胞和CCR4-CAR T细胞产物之间没有差异(数据未显示)。此外,在PMA-离子霉素刺激后,CCR4-CAR T细胞产生降低的Th2、Th17和T-reg相关细胞因子水平,同时维持Th1相关细胞因子、INF- γ 和促炎细胞因子(TNF- α 和IL-2)的产生(图18)。这些结果表明,用CCR4-CAR转导T细胞导致CCR4阳性的Th2和Th17及Treg亚群自相残杀耗竭,并维持CCR4阴性的Th1 CD4⁺亚群。通过改变Th亚群分布,这种耗竭可对其它CAR T细胞产物有益。为了解决这一问题,使用CCR4-CAR T细胞制备富含Th1的CD19-CAR T细胞产物。添加仅10%的CCR4-CAR T细胞耗竭CD19-CAR T细胞中总的CCR4阳性T细胞亚群(图19),从而产生相对而言Th1为主的CD19-CAR T细胞产物(图20)。

[0454] 实施例5:CCR4-CAR T细胞在体外对CCR4阳性T细胞肿瘤细胞系有反应并将其裂解

[0455] 由于靶抗原密度影响CAR T细胞反应,因此对源自T细胞恶性肿瘤患者、显示一定范围的CCR4表达的三个细胞系测试了CCR4-CAR T细胞组的裂解活性(图21)。所有CCR4-CAR T细胞均裂解表达CCR4的细胞系。未观察到CCR4-CAR T细胞对HH即最高表达CCR4的细胞系的裂解活性存在差异。在分别中CCR4表达和低CCR4表达的细胞系MJ和HuT78中,CCR4 (KW_H2L/L2H) -CAR T细胞展现出最高的杀伤能力,而CCR4 (1-49_H2L/L2H) -CAR T细胞的杀伤能力最低(图22)。所有CCR4-CAR T细胞在CCR4刺激后均脱粒,如CD107a上调所反映出来的,但抗CCR4 (1-49_H2L/L2H) -CAR T细胞和CCR4 (h1567_H2L/L2H) -CAR T细胞在基线处表现出靶细胞非依赖性脱粒(图23)。在PMA/离子霉素的抗原非依赖性刺激下,所有CCR4-CAR T细胞均分泌INF- γ 、IL-2和TNF- α 。

[0456] 实施例6:CCR4-CAR T细胞在HH细胞异种移植小鼠模型中根除肿瘤细胞

[0457] 为了比较CCR4-CAR的体内抗肿瘤功效,用低剂量(0.5×10^6 个)CAR阳性T细胞或对照UTD T细胞处理HH细胞异种移植小鼠以突显在效率上的任何差异(图24)。通过BLI跟踪肿瘤负担超过6个月以评估长期缓解情况。CCR4 (KW_H2L/L2H) -CAR T细胞显示出优异的抗肿瘤功效,并且仅CCR4 (KW_L2H) -CAR T细胞治愈了所有小鼠(图25),在实验过程中具有100%的存活益处(图26)。优异的抗肿瘤功效与更好的T细胞移入有关;抗CCR4 (KW_H2L/L2H) -CAR T细胞引发稳健的T细胞移入(图27)。此外,CCR4 (h1567_L2H) -CAR T细胞表现出轻度抗肿瘤功效和延长的生存益处。在整个实验过程中未观察到明显的非肿瘤相关毒性——包括GVHD和体重减轻(图28)。基于这些结果,选择CCR4 (KW_L2H) -CAR T和CCR4 (h1567_L2H) -CAR T细

胞进行进一步评估。

[0458] 实施例7:CCR4-CAR T细胞的抗肿瘤功效和T细胞移入与CD19-CAR T细胞相当或比其更优

[0459] 为进一步评估CCR4-CAR T细胞的体内功效,将它们清除表达CCR4和CD19两者的肿瘤的能力与经验证的抗CD19-CAR T细胞进行比较。用CD19转导HH细胞以获得CCR4和CD19双阳性细胞。通过FCM分选细胞以实现CD19的100%表达(HH-CBG-GFP-t19)(图29)。肿瘤接种后第7天,用 1×10^6 个HH-CBG-GFP-t19细胞接种NSG小鼠,并用 2×10^6 个CAR阳性T细胞或UTD细胞处理(图30)。CD19-CAR T细胞和CCR4(h1567_L2H)-CAR T细胞对表达CCR4和CD19的肿瘤的抗肿瘤效果相似,而CCR4(KW_L2H)-CAR T细胞引起完全缓解(图31)。此外,CCR4(KW_L2H)-CAR T细胞在早期(第7天)表现出比CD19-CAR T细胞更高的T细胞移入水平,而在后期(第14天;图32和图33)表现出相当的T细胞移入水平。除了CD19-CAR T细胞组中的一只小鼠发展GVHD并显示外周血中T细胞快速增加之外,第28天在外周血中可检测到的T细胞非常少(图33)。CCR4(KW_L2H)-CAR T细胞和CD19-CAR T细胞产生的IFN- γ 和TNF- α 水平相当,但CCR4(h1567_L2H)-CAR T细胞分泌的细胞因子水平较低(图34)。这些结果确立了前导CCR4(KW_L2H)-CAR T细胞对表达CCR4的肿瘤细胞系的体外和体内功效。

[0460] 实施例8:CCR4-CAR T细胞对原代CTCL细胞有反应并将其裂解

[0461] 为验证CCR4(KW_L2H)CAR T细胞能够靶向并杀伤T细胞淋巴瘤患者样品,测试其对患者来源的原代CTCL细胞的裂解活性。最初,证实分离的肿瘤细胞表达CTCL特有的表型标志物;CD4(+)、CCR4(+)、CD7(-)、CD25(-)、CD157(-)和通过流式细胞术32表达的CCR4(图35)。此外,证实患者样品中含有低频正常细胞(少于5%)。与CTCL患者样品共培养时,CCR4(KW_L2H)-CAR T细胞被激活(如CD107a上调所示)并分泌IFN- γ 、IL-2和TNF- α 细胞因子(图36)。重要的是,CCR4(KW_L2H)-CAR T细胞特异性且有效地裂解CTCL患者肿瘤细胞(图37)。

[0462] 实施例9:用T细胞耗竭系统装备抗CCR4嵌合抗原受体T细胞

[0463] 抗CCR4-CAR T细胞(CCR4CART细胞)有效地裂解靶肿瘤细胞以及正常的表达CCR4的T细胞,包括调节T细胞(Treg)和2型辅助T细胞(Th2)。这些细胞部分的耗竭可通过相对增加Th1和CD8 T细胞来“增强”CCR4CART细胞产物,而正常Treg的完全丧失在转化为临床表现时可能导致严重的自身免疫反应。已报告的病例,即莫格利珠单抗疗法后出现高CD8 T细胞浸润的史蒂文斯-约翰逊综合征可能与Treg耗竭有关。此外,在一些数据库中已报告了正常器官(包括肾脏、肺和胰腺)中的CCR4表达,但幸运的是,其表达水平较低,并且在莫格利珠单抗的临床研究中未报告除可控制的血小板减少以外的严重器官特异性不良作用。尽管如此,本文所述的CCR4-CAR T细胞疗法的活性增强可能会诱发此类毒性。因此,本文考虑了通过自杀系统调节CCR4-CAR、CAR T细胞的化疗或抗生素耗竭策略或诱导型CAR表达策略。

[0464] 作为在观察和/或检测到抗CCR4 CAR T细胞介导的毒性时关闭CART细胞的安全开关,CCR4CAR(KW_L2H)慢病毒载体进一步用包括截短的EGFR(EGFRt)(Michael C.Jensen et al.美国专利号US8802374B2)、CD20(Sarah K.Tasian et al.Blood.2017Apr 27;129(17):2395-2407)、诱导型胱天蛋白酶9(Karin C.Straathof et al.Blood.2005Jun 1;105(11):4247-4254)或单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSVTK)(Science.1997Jun13;276(5319):1719-24)的安全开关通过P2A自切割序列修饰(图38-图41)。预期这些系统中的每一个在施用相应的安全开关剂,即分别为抗EGFR单克隆抗体(mAb)(例如西妥昔单抗)、抗CD20 mAb(例如

利妥昔单抗)、二聚化药物(AP1903)和更昔洛韦(GCV)时会引发CAR T细胞耗竭。tEGFR与CCR4CAR在T细胞上的共表达已得到证实(数据未显示)。此外,使用HSVTK耗竭系统,CCR4CAR T细胞被GCV以剂量依赖性方式耗竭(图42)。

[0465] 包括ATLL在内的一些肿瘤创造了高TGF β 肿瘤微环境(Blood (2011) 118(7):1865-1876.),这可引发免疫细胞功能障碍。此外,在抗CD3或抗CD3/28表达后,TGF β 会引发T细胞上的CCR4表达,这可能会导致不希望的CAR T细胞自相残杀杀伤。因此,通过插入能阻断TGF β 信号传导的显性负性II型TGF β 受体(dnTGF β RII),进一步修饰抗CCR4CAR(KW-L2H)-HSVTK质粒载体(Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18; 94(6):2386-91.)。生成三个具有不同CAR、HSVTK和dnTGF β RII顺序的CCR4CAR(KW-L2H)-HSVTK-dnTGF β RII构建体;dnTGF β RII-CCR4CAR(KW-L2H)-HSVTK(最高)、CCR4CAR(KW-L2H)-dnTGF β RII-HSVTK(中间)和CCR4CAR(KW-L2H)-HSVTK-dnTGF β RII(最末)(图43-图45)。这些载体类似地产生细胞因子(数据未显示),而dnTGF β RII-CCR4CAR(KW-L2H)-HSVTK(最高)具有引发最高杀伤活性的趋势(图46)。

[0466] 将这些系统与CCR4-CAR组合能够克服CCR4-CAR T细胞疗法最关键的问题即瘤外毒性,并且增强其临床应用的可行性。此外,作为CCR4CAR T细胞的靶肿瘤的ATLL,产生高水平的TGF β 。阻断TGF β RII可使CAR T细胞从肿瘤微环境的功能障碍中解救出来。此外,阻断TGF β 信号传导可防止CCR4过表达,从而避免有效CAR T细胞的所不希望的自相残杀损失。

[0467] 实施例10:敲低CCR4以制备CCR4-CAR T细胞产物而无自相残杀事件(CCR4 k/dCCR4-CAR T细胞)

[0468] 如本文证明的,CCR4-CAR T细胞相互杀伤并最终根除CAR T细胞产物中的CCR4阳性T细胞,从而导致CCR4-CAR T细胞的生产效率和功能增强。本文考虑到的减少或根除表达CCR4的T细胞自相残杀的另一种方法涉及在CCR4-CAR转导之前敲低(k/d)或敲除(k/o)这些细胞中的CCR4。这可通过本领域已知的任何方法实现,诸如通过用RNAi(shRNA或siRNA)、基因工程(例如,通过CRISPR/Cas9)或用基于蛋白质的系统(例如,含C-末端KDEL基序融合体的抗CCR4 scFv)对T细胞进行另外的修饰。为此,构建了四个CCR4靶向shRNA(sh-CCR4),以及一个Cre靶向shRNA(sh-Cre)作为对照(表4)。用EcaRI和BamHI位点将sh-Cre或sh-CCR4 shRNA克隆到pLV5IN-mU6-MCS-PGK-Neo质粒中。在表达CCR4的细胞系HH和ATN-1中测试shRNA(图47)。所有sh-CCR4均可引发CCR4敲低,其中效率水平是不同的;sh-CCR4#1和#2类似地引发有效的CCR4 k/d,而sh-CCR4#4引发中度的CCR4 k/d,以及CCR4#3显示出轻度的CCR4 k/d。

[0469] 为了建立具有最小或无自相残杀事件的CCR4-CAR T细胞,在第1天用sh-CCR4转导原代T细胞以实现CCR4 k/d,然后在抗CD3/28刺激后第3天和第4天用CCR4CAR(KW-L2H)转导(图48A)。与在这些细胞系上的效率相似,任意shCCR4都引发了CCR4 k/d,但其中效率是不同的;sh-CCR4#1和#2类似地引发最有效的CCR4 k/d,而sh-CCR4#4引发中度的CCR4 k/d,以及CCR4#3显示出轻度的CCR4 k/d(图48B)。

[0470] 重要的是,在未用shCCR4转导的CAR T细胞中实现了最有效的T细胞增殖和CAR转导,而在用最低效的shCCR4(shCCR4#3)转导的CAR T细胞中实现了相似的效率(图48C和图48D)。此外,对CCR4 k/d最有效的sh-CCR4(sh-CCR4#1)在某种程度上损害有效的T细胞增殖和CAR转导。

[0471] 这些结果证实,自相残杀事件(CCR4-CAR T细胞产物中CCR4阳性细胞的相互杀伤)有益于CCR4-CAR T的产生。尽管如此,仔细选择sh-CCR4构建体,能够实现与原始CCR4-CAR T细胞产物相当的CAR转导和T细胞增殖效率水平。

[0472] 实施例11:CCR4-CAR T细胞(KW_L2H)能够在体内根除抗莫格利珠单抗T细胞肿瘤

[0473] 在临床环境中,将对莫格利珠单抗治疗后难治性或复发的疾病的患者施用CCR4-CAR T细胞。要注意的是先前的mAb疗法导致表位阻断,因为CCR4-CAR T细胞和莫格利珠单抗共享其在CCR4抗原上的表位。因此,为解决这一问题,在莫格利珠单抗难治性T细胞淋巴瘤小鼠模型中测试CCR4-CAR T细胞(图49A)。用两种剂量的莫格利珠单抗组合PBMC处理NSC小鼠中的HH肿瘤,这会导致难治性疾病。随后用CCR4-CAR(KW_L2H) T细胞处理难治性肿瘤。CCR4-CAR T细胞以与抗肿瘤类似的方式有效地抑制和根除肿瘤,而无需先前莫格利珠单抗治疗,这表明CCR4-CAR T细胞疗法对莫格利珠单抗处理前和难治性肿瘤的可行性(图49B)。

[0474] 实施例12:能够从被肿瘤细胞高度污染的患者来源的PBMC安全有效地建立CCR4-CAR T细胞

[0475] ATLL病患者通常接受大量治疗,并且这些患者的PBMC被肿瘤细胞污染。为测试是否能够从这些患者中产生CCR4-CAR T细胞,从一名ATLL患者(70%的血细胞为肿瘤细胞)中采集PBMC并测试CAR T产生。在抗CD3/28刺激后第1天,用CD19CAR或CCR4CAR(KWL2H)转导来自患者和正常供体的PBMC。与来自正常供体的PBMC相比,患者来源的PBMC表现出较低的转导功效,但最终在患者和正常供体来源的产物中,CCR4-CAR阳性细胞的百分比增加并达到超过90%(图50A)。此外,被污染的CD7(-)、CADM1(+)和CCR4(+)肿瘤细胞在CCR4-CAR T细胞产物中几乎被根除,但在CD19-CAR T细胞产物中未被根除(CAR阳性T细胞群中为3.03% v.s 40.2%,而CAR阴性T细胞群中为0% vs 24.5%)(图50B)。此结果证实,能够从被肿瘤细胞高度污染的患者来源PBMC安全有效地建立CCR4-CAR T细胞。

[0476] 实施例13:用于体内治疗T细胞恶性肿瘤和实体肿瘤的CCR4-CAR T细胞

[0477] 包括CTCL、ATLL和PTCL在内的成熟T细胞淋巴瘤通常关联着不良预后。尽管抗CCR4 mAb(莫格利珠单抗)等新疗法可延迟肿瘤进展,但罕有实现治愈性治疗。本研究证明,莫格利珠单抗衍生的CCR4-CAR T细胞可有效靶向CCR4阳性肿瘤细胞系和原代CTCL细胞并且可在临床前模型中根除已建立的肿瘤,这优于先前报告的h1567和mAb2-3衍生的CAR T细胞(Perera LP, et al. Am J Hematol. 2017; 92(9):892-901)。本研究还证明了自相残杀事件的机制及其与CAR T细胞功能的相关性;CCR4-CAR T细胞的优异抗肿瘤功效与CCR4阳性T细胞的快速和完全的自相残杀衰竭有关。此外,本文提供的数据显示,自相残杀的程度是scFv依赖性的,影响CCR4-CAR能够顺式掩蔽靶CCR4的程度。KW-0761顺式仅部分地结合CCR4,允许不受阻碍的自相残杀,但源自h1567及其衍生物的CAR顺式几乎完全阻断表位,允许CCR4-CAR阳性细胞存续。这一观察结果与先前的报告相符,即无意中导入白血病B细胞的CD19-CAR通过与白血病细胞表面上的CD19表位结合,掩蔽其不被CD19-CAR T细胞识别,从而引发白血病耐药性。

[0478] 本文考虑到,相对于Th2和T_{reg},Th1为主的CAR T细胞产物将会增强CAR T细胞的抗肿瘤活性,因为Th1亚群在抗癌免疫中发挥核心作用,而Th2和T_{reg}可能会与之对抗。CD19-CAR T细胞通过与少量CCR4 CAR T细胞混合获得了这种“增强的”CAR T细胞产物,这表明CCR4-CAR T细胞可用作改善其它CAR T细胞产物的工具。这一结果还表明,宿主正常的

CCR4阳性T细胞可能会被CCR4-CAR T细胞耗竭,就像莫格利珠单抗治疗中所示的那样。Th2介导的炎症通常有益于肿瘤生长和癌症免疫逃避,并且较高的Th2浸润关联着不良的治疗结局。Treg在肿瘤生长和免疫逃避中也有重要作用。Treg可抑制效应T细胞介导的肿瘤杀伤,而向TME高Treg浸润关联着多种类型的肿瘤包括结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、淋巴瘤和肝细胞癌的不良效果。在动物模型中,即使Treg的短暂耗竭也可增强肿瘤疫苗疗法的功效。因此,本文考虑到,除了直接杀伤CCR4阳性肿瘤细胞外,CCR4-CAR T细胞对CCR4阳性Treg和Th2的耗竭一般将会促成癌症的抗肿瘤免疫。实际上,已在实体肿瘤患者中测试了莫格利珠单抗——作为Treg耗竭疗法。在一些患者中观察到莫格利珠单抗之后,CCR4阳性T细胞显著减少,以及对癌症/睾丸(CT)抗原的免疫反应和对甲状腺过氧化物酶的自身抗体反应显著降低。

[0479] 总之,本研究鉴定了高活性的源自KW-0761(莫格利珠单抗)的CCR4-CAR T细胞。显示出功效关联着Th2、Treg和Th17亚群(全都为CCR4阳性)的自相残杀耗竭,同时庇护Th1亚群(CCR4阴性)。本文还考虑到,CCR4-CAR T细胞形式将有益于T细胞恶性肿瘤患者的治疗以及治疗包括实体肿瘤在内的其它癌症的Th2和Treg耗竭疗法。

[0480] 列举的实施方式

[0481] 提供以下列举的实施方式,其编号不应被解释为指定重要性级别。

[0482] 实施方式1提供抗CC趋化因子受体4(CCR4)嵌合抗原受体(CAR),其包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

[0483] 实施方式2提供实施方式1的CAR,其中抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区(HCDR),所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0484] 实施方式3提供实施方式1或实施方式2的CAR,其中抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区(LCDR),所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0485] 实施方式4提供实施方式1-3中任一项的CAR,其中抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

[0486] 实施方式5提供实施方式1-4中任一项的CAR,其中抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv)。

[0487] 实施方式6提供实施方式1-5中任一项的CAR,其中抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv),其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

[0488] 实施方式7提供实施方式1-6中任一项的CAR,其中抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0489] 实施方式8提供实施方式1-7中任一项的CAR,其中抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0490] 实施方式9提供实施方式1-8中任一项的CAR,其中抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:116具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0491] 实施方式10提供前述实施方式中任一项的CAR,其中CAR还包括CD8 α 铰链,任选地其中CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

[0492] 实施方式11提供前述实施方式中任一项的CAR,其中跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域:人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的跨膜结构域。

[0493] 实施方式12提供前述实施方式中任一项的CAR,其中跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域,任选地其中CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

[0494] 实施方式13提供前述实施方式中任一项的CAR,其中胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

[0495] 实施方式14提供前述实施方式中任一项的CAR,其中胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域:TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3 (CD276),或其变体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞内结构域。

[0496] 实施方式15提供前述实施方式中任一项的CAR,其中胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域,其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

[0497] 实施方式16提供前述实施方式中任一项的CAR,其中胞内结构域包括选自以下的蛋白质的胞内信号传导结构域:人CD3 ζ 链 (CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc ϵ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d,或其变体。

[0498] 实施方式17提供前述实施方式中任一项的CAR,其中胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体,其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

[0499] 实施方式18提供前述实施方式中任一项的CAR,其中CAR包括:抗CCR4抗原结合结构域,其包括抗CCR4 scFv;CD8 α 铰链;CD8 α 跨膜结构域;胞内结构域,其包括4-1BB共刺激结构域;和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

[0500] 实施方式19提供实施方式18的CAR,其中CAR还包括CD8前导序列,其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

[0501] 实施方式20提供前述实施方式中任一项的CAR,其中CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0502] 实施方式21提供前述实施方式中任一项的CAR,其中CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列编码。

[0503] 实施方式22提供前述实施方式中任一项的CAR,其中CAR通过可自切割连接体与安全开关连接,并且其中安全开关结合安全开关剂。

[0504] 实施方式23提供实施方式22的CAR,其中安全开关选自:(a) 截短的EGFR (EGFRt),其中安全开关剂是抗EGFR抗体,任选地是西妥昔单抗;(b) CD20,其中安全开关剂是抗CD20抗体,任选地是利妥昔单抗;(c) 诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9),其中安全开关剂是AP1903;

和(d)单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSVTK),其中安全开关剂是更昔洛韦(GCV)。

[0505] 实施方式24提供实施方式22或实施方式23的CAR,其中CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体(dnTGFbRII)连接。

[0506] 实施方式25提供实施方式22或实施方式23的CAR,其中安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGFb受体(dnTGFbRII)连接。

[0507] 实施方式26提供包括编码抗CCR4 CAR的多核苷酸序列的核酸,其中CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

[0508] 实施方式27提供实施方式26的核酸,其中抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区(HCDR),所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0509] 实施方式28提供实施方式25或实施方式27的核酸,其中抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区(LCDR),所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0510] 实施方式29提供实施方式26-28中任一项的核酸,其中抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

[0511] 实施方式30提供实施方式26-29中任一项的核酸,其中抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv)。

[0512] 实施方式31提供实施方式26-30中任一项的核酸,其中抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv),其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

[0513] 实施方式32提供实施方式26-31中任一项的核酸,其中抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0514] 实施方式33提供实施方式26-32中任一项的核酸,其中抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0515] 实施方式34提供实施方式26-33中任一项的核酸,其中抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0516] 实施方式35提供前述实施方式中任一项的核酸,其中CAR还包括CD8 α 铰链,任选地其中CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

[0517] 实施方式36提供前述实施方式中任一项的核酸,其中跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域:人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0518] 实施方式37提供前述实施方式中任一项的核酸,其中跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域,任选地其中CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

[0519] 实施方式38提供前述实施方式中任一项的核酸,其中胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

[0520] 实施方式39提供前述实施方式中任一项的核酸,其中胞内结构域包括选自以下的

蛋白质的共刺激结构域：TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3 (CD276)，或其变体，或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞内结构域。

[0521] 实施方式40提供前述实施方式中任一项的核酸，其中胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域，其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

[0522] 实施方式41提供前述实施方式中任一项的核酸，其中胞内结构域包括选自以下的蛋白质的胞内信号传导结构域：人CD3 ζ 链 (CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d，或其变体。

[0523] 实施方式42提供前述实施方式中任一项的核酸，其中胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体，其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

[0524] 实施方式43提供前述实施方式中任一项的核酸，其中CAR包括：抗CCR4抗原结合结构域，其包括抗CCR4 scFv；CD8 α 铰链；CD8 α 跨膜结构域；胞内结构域，其包括4-1BB共刺激结构域；和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

[0525] 实施方式44提供实施方式43的核酸，其中CAR还包括CD8前导序列，其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

[0526] 实施方式45提供前述实施方式中任一项的核酸，其中CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0527] 实施方式46提供前述实施方式中任一项的核酸，其中CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列编码。

[0528] 实施方式47提供前述实施方式中任一项的核酸，其中CAR通过可自切割连接体与安全开关连接，并且其中安全开关结合安全开关剂。

[0529] 实施方式48提供实施方式47的核酸，其中安全开关选自：(a) 截短的EGFR (EGFRt)，其中安全开关剂是抗EGFR抗体，任选地是西妥昔单抗；(b) CD20，其中安全开关剂是抗CD20抗体，任选地是利妥昔单抗；(c) 诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9)，其中安全开关剂是AP1903；和(d) 单纯疱疹病毒-1胸苷激酶 (HSVTK)，其中安全开关剂是更昔洛韦 (GCV)。

[0530] 实施方式49提供实施方式47或实施方式48的核酸，其中CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGF β 受体 (dnTGF β RII) 连接。

[0531] 实施方式50提供实施方式47或实施方式48的核酸，其中安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGF β 受体 (dnTGF β RII) 连接。

[0532] 实施方式51提供载体，其包括实施方式26-50中任一项的核酸。

[0533] 实施方式52提供实施方式51的载体，其中载体是选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体的病毒载体。

[0534] 实施方式53提供实施方式52的载体，其中病毒载体是慢病毒载体。

[0535] 实施方式54提供修饰的免疫细胞或其前体细胞，其包括实施方式1-25中任一项的CAR、实施方式26-50中任一项的核酸和/或实施方式51-53中任一项的载体。

[0536] 实施方式55提供实施方式54的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其还包括以下中的一项或多项;

[0537] (a) CCR4无效敲除等位基因;

[0538] (b) 被抑制的CCR4基因表达;和

[0539] (c) 包括抗CCR4 scFv和KDEL基序的融合蛋白和/或编码所述融合蛋白的核酸。

[0540] 实施方式56提供实施方式55的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中CCR4无效敲除等位基因或被抑制的CCR4基因表达是通过包括选自以下的核酸酶的基因工程技术获得的:成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和锌指核酸酶。

[0541] 实施方式57提供实施方式55或56的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其还包括抑制CCR4基因表达的抑制性RNA分子。

[0542] 实施方式58提供实施方式57的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中抑制性RNA分子选自:RNA干扰(RNAi) RNA、短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、反式作用siRNA(tasiRNA)、微小RNA(miRNA)、反义RNA(asRNA)、长非编码RNA(lncRNA)、CRISPR RNA(crRNA)、反式激活crRNA(tracrRNA)、指导RNA(gRNA)、单指导RNA(sgRNA)、双链RNA(dsRNA)、核酶及其任意组合。

[0543] 实施方式59提供实施方式54-58中任一项的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中修饰的细胞是自体细胞。

[0544] 实施方式60提供实施方式54-59中任一项的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中修饰的免疫细胞源自外周血单核细胞(PBMC)。

[0545] 实施方式61提供实施方式60的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中PBMC包括肿瘤细胞。

[0546] 实施方式62提供实施方式54-61中任一项的修饰的免疫细胞或其前体细胞,其中修饰的免疫细胞或其前体细胞是从人对象分离的细胞。

[0547] 实施方式63提供实施方式54-62中任一项所述的修饰免疫细胞或其前体细胞,其中修饰的免疫细胞是修饰的T细胞。

[0548] 实施方式64提供用于产生修饰的免疫细胞或其前体细胞的方法,包括将实施方式26-50中任一项的核酸或实施方式51-53中任一项的载体导入所述免疫细胞或其前体细胞。

[0549] 实施方式65提供实施方式58的方法,其中载体是通过病毒转导导入的。

[0550] 实施方式66提供治疗对其有需要的对象中的癌症的方法,包括向对象施用实施方式54-63中任一项的修饰的免疫细胞或前体细胞,或通过实施方式64或实施方式65的方法产生的修饰的免疫细胞或其前体细胞。

[0551] 实施方式67提供实施方式66的方法,其中修饰的细胞耗竭对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞,从而治疗癌症。

[0552] 实施方式68提供实施方式66或67的方法,其中对象先前已经施用莫格利珠单抗。

[0553] 实施方式69提供实施方式66-68中任一项的方法,其中癌症是莫格利珠单抗难治的。

[0554] 实施方式70提供治疗对其有需要的对象中的癌症的方法,包括向对象施用包括抗CCR4 CAR的修饰的T细胞,其中CAR包括抗CCR4抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

[0555] 实施方式71提供实施方式70的方法,其中抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个重链可变区(HCDR),所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0556] 实施方式72提供实施方式70或实施方式71的方法,其中抗CCR4抗原结合结构域包括至少一个轻链可变区(LCDR),所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0557] 实施方式73提供实施方式70-72中任一项的方法,其中抗CCR4抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

[0558] 实施方式74提供实施方式70-73中任一项的方法,其中抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv)。

[0559] 实施方式75提供实施方式70-74中任一项的方法,其中抗CCR4抗原结合结构域是抗CCR4单链可变片段(scFv),其具有源自莫格利珠单抗的重链和轻链。

[0560] 实施方式76提供实施方式70-75中任一项的方法,其中抗CCR4抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:112具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0561] 实施方式77提供实施方式70-76中任一项的方法,其中抗CCR4抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:114具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0562] 实施方式78提供实施方式70-77中任一项的方法,其中抗CCR4抗原结合结构域包括与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0563] 实施方式79提供前述实施方式中任一项的方法,其中CAR还包括CD8 α 铰链,任选地其中CD8 α 铰链包括SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列。

[0564] 实施方式80提供前述实施方式中任一项的方法,其中跨膜结构域包括选自以下的跨膜结构域:人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、ICOS和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0565] 实施方式81提供前述实施方式中任一项的方法,其中跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域,任选地其中CD8 α 跨膜结构域包括SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列。

[0566] 实施方式82提供前述实施方式中任一项的方法,其中胞内结构域包括共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

[0567] 实施方式83提供前述实施方式中任一项的方法,其中胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域:TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3(CD276),或其变体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的胞内结构域。

[0568] 实施方式84提供前述实施方式中任一项的方法,其中胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域,其任选地包括SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列。

[0569] 实施方式85提供前述实施方式中任一项的方法,其中胞内结构域包括选自以下的

蛋白质的胞内信号传导结构域：人CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d,或其变体。

[0570] 实施方式86提供前述实施方式中任一项的方法,其中胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内信号传导结构域或其变体,其任选地包括SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列。

[0571] 实施方式87提供前述实施方式中任一项的方法,其中CAR包括：抗CCR4抗原结合结构域,其包括抗CCR4 scFv;CD8 α 铰链;CD8 α 跨膜结构域;胞内结构域,其包括4-1BB共刺激结构域;和CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

[0572] 实施方式88提供实施方式87的方法,其中CAR还包括CD8前导序列,其任选地包括SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列。

[0573] 实施方式89提供前述实施方式中任一项的方法,其中CAR包括与SEQ ID NO:30、54、62、70、82、90和102中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0574] 实施方式90提供前述实施方式中任一项的方法,其中CAR由与SEQ ID NO:29、53、61、69、81、89和101中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核苷酸序列编码。

[0575] 实施方式91提供前述实施方式中任一项的方法,其中CAR通过可自切割连接体与安全开关连接,并且其中安全开关结合安全开关剂。

[0576] 实施方式92提供实施方式91的方法,其中安全开关选自：(a) 截短的EGFR (EGFRt), 其中安全开关剂是抗EGFR抗体,任选地是西妥昔单抗；(b) CD20,其中安全开关剂是抗CD20抗体,任选地是利妥昔单抗；(c) 诱导型胱天蛋白酶9 (iCasp9), 其中安全开关剂是AP1903；和(d) 单纯疱疹病毒-1胸苷激酶 (HSVTK), 其中安全开关剂是更昔洛韦 (GCV)。

[0577] 实施方式93提供实施方式91或实施方式92的方法,其中CAR通过可自切割连接体与显性负性II型TGF β 受体 (dnTGF β RII) 连接。

[0578] 实施方式94提供实施方式91或实施方式92的方法,其中安全开关通过可自切割连接体与显性负性II型TGF β 受体 (dnTGF β RII) 连接。

[0579] 实施方式95提供实施方式91-94中任一项的方法,还包括向对象施用安全开关剂。

[0580] 实施方式96提供实施方式70-95中任一项的方法,其中修饰的T细胞耗竭对象中的CCR4阳性T细胞而非CCR4阴性T细胞,从而治疗癌症。

[0581] 实施方式97提供实施方式70-96中任一项的方法,其中修饰的T细胞源自PBMC。

[0582] 实施方式98提供实施方式97的方法,其中PBMC包括肿瘤细胞。

[0583] 实施方式99提供实施方式70-98中任一项的方法,其中修饰的T细胞是人T细胞。

[0584] 实施方式100提供实施方式70-99中任一项的方法,其中修饰的T细胞是自体的。

[0585] 实施方式101提供实施方式70-100中任一项的方法,其中对象是人。

[0586] 实施方式102提供实施方式70-101中任一项的方法,其中对象先前已经施用莫格利珠单抗。

[0587] 实施方式103提供实施方式70-102中任一项的方法,其中癌症是莫格利珠单抗难治的。

[0588] 其它实施方式

[0589] 本文引用的每件专利、专利申请和出版物的公开内容其整体在此通过引用并入本文。虽然已经参考具体实施方式公开了本发明,但显然本领域技术人员可以在不背离本发明的真实精神和范围的情况下设计出本发明的其它实施方式和变型。所附权利要求意图被解释为包括所有这样的实施方式和等同变型。

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学董事会
国立癌症中心

<120> CCR4靶向嵌合抗原受体细胞疗法

<130> 046483-7316W01 (02797)

<150> US 63/148,489

<151> 2021-02-11

<160> 153

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) HCDR1

<400> 1

aactacggca tgagc

15

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) HCDR1

<400> 2

Asn Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) HCDR2

<400> 3

acaatcagca gcgccagcac ctacagctac taccgccgata gcgtgaaggg c

51

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CCR4(KW_L2H) HCDR2
<400> 4
Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CCR4(KW_L2H) HCDR3
<400> 5
cacagcgacg gcaacttcgc ctttggtat 30
<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CCR4(KW_L2H) HCDR3
<400> 6
His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr
1 5 10
<210> 7
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CCR4(KW_L2H) LCDR1
<400> 7
agatccagcc ggaacatcgt gcacatcaac ggcgacacct acctggaa 48
<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CCR4(KW_L2H) LCDR1
<400> 8
Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu

1	5	10	15
<210>	9		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CCR4(KW_L2H) LCDR2		
<400>	9		
aaggtgtcca accggttcag c			21
<210>	10		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CCR4(KW_L2H) LCDR2		
<400>	10		
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser			
1	5		
<210>	11		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CCR4(KW_L2H) LCDR3		
<400>	11		
ttccaaggct ctctgctgcc ctggaca			27
<210>	12		
<211>	9		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CCR4(KW_L2H) LCDR3		
<400>	12		
Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr			
1	5		
<210>	13		
<211>	753		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		

<220>

<223> CCR4(KW_H2L) scFv

<400> 13

```

gaagtgcagc tggttgagtc tggcggagat ctggtgcagc ctggcagaag cctgagactg      60
tcttgtgccg ccagcggctt catcttcagc aactacggca tgagctgggt ccgacaggcc      120
cctggaaaag gccttgaatg ggtcgccaca atcagcagcg ccagcaccta cagctactac      180
cccgatagcg tgaagggcag attcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac      240
ctgcagatga actccctgcg cgtggaagat acagccctgt actactgcgg cagacacagc      300
gacggcaatt tcgcctttgg ctattggggc cagggcaccc tggttaccgt ttctagcgga      360
ggaggtggat caggtggagg tggaagcggg ggaggagggt ccggcggcgg aggatcagat      420
gttctgatga cacagagccc tctgagcctg cctgtgacac ctggcgaacc tgccagcatc      480
agctgcagat ccagccggaa catcgtgcac atcaacggcg acacctacct ggaatggtat      540
ctgcagaagc ccggccagtc tcctcagctg ctgatctaca aggtgtccaa ccggttcage      600
ggcgtgcccc atagattttc tggcagcggc tctggcaccg acttcaccct gaagatctcc      660
agagtggaag ccgaggacgt gggcgtctac tactgcttcc aaggctctct gctgccttgg      720
acatttggac agggcaccaa ggtggaaatc aag                                     753

```

<210> 14

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_H2L) scFv

<400> 14

```

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

```

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr	
130	135 140
Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile	
145	150 155 160
Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr	
	165 170 175
Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile	
	180 185 190
Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
	195 200 205
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala	
	210 215 220
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp	
	225 230 235 240
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	245 250

<210> 15

<211> 753

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) scFv

<400> 15

gacgtgctga tgacacagag ccctctgagc ctgcctgtga cacctggcga acctgccagc	60
atcagctgca gatccagccg gaacatcgtg cacatcaacg gcgacaccta cctggaatgg	120
tatctgcaga agcccggcca gtctcctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc	180
agcggcgctgc ccgatagatt ttctggcagc ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc	240
tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgct tccaaggctc tctgctgccc	300
tggacatttg gccagggcac caagtgga atcaaggag gaggtggatc aggtggaggt	360
ggaagcgggg gaggaggttc cggcggcgga ggatcagaag ttcagctggg tgagtctggc	420
ggcgacctgg ttcagcctgg cagatctctg agactgagct gtgccgccag cggcttcac	480
ttcagcaact acggcatgag ctgggtccga caggccctg gaaaaggact ggaatgggtc	540
gccacaatca gcagcgccag cacctacagc tactacccc atagcgtgaa gggcagattc	600
accatcagcc gggacaacgc caagaacagc ctgtacctgc agatgaactc cctgcgcgtg	660
gaagatacag ccctgtacta ttgcggcaga cacagcgacg gcaacttcgc ctttggtat	720
tggggccagg gaaccctggt caccgtttct agt	753

<210> 16

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) scFv

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(1-49_H2L) scFv

<400> 17

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggagccgag gtgaagaagc ctggagcttc cgtcaaggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcgcc agcagctgga tgcactggat gcggcaggca      120
cctggacagg gcctcgaatg gatcggctgg atcaaccccg gcaacgtgaa caccaagtac      180
aacgagaagt tcaagggcag ggccaccctg accgtggaca ccagcaccaa caccgcctac      240
atggaactga gcagcctgcg gagcaggagc accgccgtgt actactgcgc cagaagcacg      300
tggtatcggc cgaatgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagcggagga      360
ggtggatcag gtggaggtgg aagcggggga ggaggttccg gcggcggagg atcagacatc      420
gtgatgaccc agagccccga cagcctggcc gtgagcctgg gcgagcgggc caccatcaac      480
tgcaagagca gccagagcat cctgtacagc agcaaccaga agaactacct ggctgtgtat      540
cagcagaagc ccggccagag cccaagctg ctgatctact gggccagcac ccgggagagc      600
ggcgtgcccc accggttttag cggcagcggc tccggcaccg acttcaccct gaccatcagc      660
agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccacc agtacaaaag cagctacacc      720
ttcggccagg gcacaaagct ggaaatcaag      750

```

<210> 18

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(1-49_H2L) scFv

<400> 18

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Ser Ser
           20           25           30
Trp Met His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Trp Ile Asn Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asn 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 Ser Thr Trp Tyr Arg Pro Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
           100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

```

115	120	125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln		
130	135	140
Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn		
145	150	155
Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr		
165	170	175
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
180	185	190
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
195	200	205
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala		
210	215	220
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Lys Ser Ser Tyr Thr		
225	230	235
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
245	250	

<210> 19

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(1-49_L2H) scFv

<400> 19

gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcga gcgggccacc	60
atcaactgca agagcagcca gagcatcctg tacagcagca accagaagaa ctacctggcc	120
tggtatcagc agaagcccgg ccagagcccc aagctgctga tctactgggc cagcaccgg	180
gagagcggcg tgcccgaccg gtttagcggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc	240
atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccaccagta caaaagcagc	300
tacaccttcg gccagggcac aaagctggaa atcaaggagg gaggtggatc aggtggaggt	360
ggaagcgggg gaggaggttc cggcggcgga ggatcacagg tgcagctggt gcagagcgga	420
gccgaggtga agaagcctgg agcttcctgc aaggtgtcct gcaaggccag cggctacacc	480
ttcgccagca gctggatgca ctggatgcgg caggcacctg gacagggcct cgaatggatc	540
ggctggatca accccggcaa cgtgaacacc aagtacaacg agaagttcaa gggcagggcc	600
accctgaccg tggacaccag caccaacacc gcctacatgg aactgagcag cctgcggagc	660
gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccaga agcacgtggt atcgccgaa tgactactgg	720
ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc	750

<210> 20

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(1-49_L2H) scFv

<400> 20

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

<210> 21

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(2-3_H2L) scFv

<400> 21

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggagccgag gtgaagaagc ctggagcttc cgtcaaggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcgcc agcgcgtgga tgcactggat gcggcaggca      120
cctggacagg gcctcgaatg gatcggctgg atcaaccccg gcaacgtgaa caccaagtac      180
aacgagaagt tcaagggcag ggccaccctg accgtggaca ccagcaccaa caccgcctac      240
atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcacg      300
tattaccggc cgctggacta ctgggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagcggagga      360
ggtggatcag gtggaggtgg aagcggggga ggaggttccg gcggcggagg atcagacatc      420
gtgatgaccc agagccccga cagcctggcc gtgagcctgg gcgagcgggc caccatcaac      480
tgcaagagca gccagagcat cctgtacagc agcaaccaga agaactacct ggcctggtat      540
cagcagaagc ccggccagag ccccaagctg ctgatctact gggccagcac ccgggagagc      600
ggcgtgcccc accggtttag cggcagcggc tccggcaccg acttcaccct gaccatcagc      660
agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccacc agtacatgag cagctacacc      720
ttcggccagg gcacaaagct ggaaatcaag      750

```

<210> 22

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(2-3_H2L) scFv

<400> 22

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Ser Ala
          20           25           30
Trp Met His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
Gly Trp Ile Asn Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
          50           55           60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asn 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 Ser Thr Tyr Tyr Arg Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

```

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
 130 135 140
 Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn
 145 150 155 160
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
 165 170 175
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 180 185 190
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 210 215 220
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Met Ser Ser Tyr Thr
 225 230 235 240
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 245 250

<210> 23

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(2-3_L2H) scFv

<400> 23

gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcga gcgggccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcatcctg tacagcagca accagaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagagcccc aagctgctga tctactgggc cagcaccggg 180
 gagagcggcg tgcccgaccg gtttagcggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccaccagta catgagcagc 300
 tacaccttcg gccagggcac aaagctggaa atcaaggag gaggtggatc aggtggaggt 360
 ggaagcgggg gaggaggttc cggcggcgga ggatcacagg tgcagctggt gcagagcgga 420
 gccgaggtga agaagcctgg agcttcctc aaggtgtcct gcaaggccag cggctacacc 480
 ttgccagcg cgtggatgca ctggatgcgg caggcacctg gacagggcct cgaatggatc 540
 ggctggatca accccggcaa cgtgaacacc aagtacaacg agaagttcaa gggcagggcc 600
 accctgaccg tggacaccag caccaacacc gcctacatgg aactgagcag cctgcggagc 660
 gaggacaccg cgtgtacta ctgcgccaga agcacgtatt accggccgct ggactactgg 720
 ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 750

<210> 24

<211> 250
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CCR4(2-3_L2H) scFv
 <400> 24
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Met Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 130 135 140
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 145 150 155 160
 Phe Ala Ser Ala Trp Met His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asn Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr
 180 185 190
 Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr
 195 200 205
 Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Arg Pro Leu Asp Tyr Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250
 <210> 25

<211> 750
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CCR4(h1567_H2L) scFv
 <400> 25
 caggtgcagc tgggtgcagag cggagccgag gtgaagaagc ctggagcttc cgtcaaggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcgcc agctactaca tgcactggat gcggcaggca 120
 cctggacagg gcctcgaatg gatcggctgg atcaaccccc gcaacgtgaa caccaagtac 180
 aacgagaagt tcaagggcag ggccaccctg accgtggaca ccagcaccaa caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgcg gagcaggagc accgccgtgt actactgcgc cagaagcacc 300
 tactaccggc ccctggacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagcggagga 360
 ggtggatcag gtggaggtgg aagcggggga ggaggttccg gcggcggagg atcagacatc 420
 gtgatgaccc agagccccga cagcctggcc gtgagcctgg gcgagcgggc caccatcaac 480
 tgcaagagca gccagagcat cctgtacagc agcaaccaga agaactacct ggcctggtat 540
 cagcagaagc ccggccagag ccccaagctg ctgatctact gggccagcac ccgggagagc 600
 ggcgtgcccc accggttttag cggcagcggc tccggcaccg acttcaccct gaccatcagc 660
 agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccacc agtacctgag cagctacacc 720
 ttcggccagg gcacaaagct ggaaatcaag 750

<210> 26

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(h1567_H2L) scFv

<400> 26

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

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
115	120	125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln		
130	135	140
Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn		
145	150	155
Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr		
165	170	175
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
180	185	190
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
195	200	205
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala		
210	215	220
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr		
225	230	235
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
245	250	

<210> 27

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(h1567_L2H) scFv

<400> 27

gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcca gcgggccacc	60
atcaactgca agagcagcca gagcatcctg tacagcagca accagaagaa ctacctggcc	120
tggtatcagc agaagcccgg ccagagcccc aagctgctga tctactgggc cagcaccggg	180
gagagcggcg tgcccgaccg gtttagcggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc	240
atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccaccagta cctgagcagc	300
tacaccttcg gccagggcac aaagctggaa atcaaggagg gaggtggatc aggtggaggt	360
ggaagcgggg gaggaggttc cggcggcgga ggatcacagg tgcagctggg gcagagcgga	420
gccgaggtga agaagcctgg agcttccgtc aaggtgtcct gcaaggccag cggctacacc	480
ttcgccagct actacatgca ctggatgcgg caggcacctg gacagggcct cgaatggatc	540
ggctggatca accccggcaa cgtgaacacc aagtacaacg agaagttcaa gggcagggcc	600
accctgaccg tggacaccag caccaacacc gcctacatgg aactgagcag cctgcggagc	660
gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccaga agcacctact accggcccct ggactactgg	720
ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc	750

<210> 28
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CCR4(h1567_L2H) scFv
 <400> 28
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 130 135 140
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 145 150 155 160
 Phe Ala Ser Tyr Tyr Met His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asn Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr
 180 185 190
 Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr
 195 200 205
 Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Arg Pro Leu Asp Tyr Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210>	29	
<211>	1500	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CCR4(KW_L2H) CAR	
<400>	29	
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa 120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac 180
ctggaatggg	atctgcagaa	gccccggccag tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc 240
aaccggttca	gcggcgtgcc	cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc 300
ctgaagatct	ccagagtgga	agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggtctt 360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca 420
ggtggaggtg	gaagcggggg	aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt 480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc 540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc tgggtccgac aggcccttg aaaaggactg 600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag 660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc 720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc 780
tttggctatt	ggggccaggg	aacctgtgtc accgtttcta gttccggaac cagcagcca 840
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcccc 900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt 960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt 1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt 1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac 1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag 1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgctaa 1500
<210>	30	
<211>	499	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CCR4(KW_L2H) CAR	
<400>	30	

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

305	310	315	320
Asp Ile Tyr Ile Trp	Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu		
	325	330	335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu			
	340	345	350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln			
	355	360	365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly			
	370	375	380
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr			
385	390	395	400
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg			
	405	410	415
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met			
	420	425	430
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu			
	435	440	445
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys			
	450	455	460
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu			
465	470	475	480
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu			
	485	490	495

Pro Pro Arg

<210> 31

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8前导

<400> 31

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga

60

ccc

63

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8前导

<400>	32	
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro		
	20	
<210>	33	
<211>	135	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD8铰链	
<400>	33	
accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg		60
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg		120
gacttcgcct gtgat		135
<210>	34	
<211>	45	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD8铰链	
<400>	34	
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala		
1	5	10
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly		
	20	25
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp		30
	35	40
<210>	35	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD8跨膜	
<400>	35	
atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtec ttctctgtc actggttacc		60
accctttact gc		72
<210>	36	
<211>	24	

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8跨膜

<400> 36

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1

5

10

15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 37

<211> 126

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BB胞内结构域

<400> 37

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 38

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BB胞内结构域

<400> 38

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1

5

10

15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20

25

30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35

40

<210> 39

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3ζ

<400> 39

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggccca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaa 339

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3ζ

<400> 40

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

<210> 41

<211> 2643

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -tEGFR

<400> 41

atggccctgc ctgtgacagc cctgtctgtg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60
 cccgatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa 120
 cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac 180
 ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc 240
 aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc 300

ctgaagatct	ccagagtgga	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaaggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctgg	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccagg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgctcg	agcccctgtc	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccat	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgga	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtgag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagaac	1560
cctggacct	tgcttctcct	ggtgacaagc	cttctgctct	gtgagttacc	acaccagca	1620
ttcctcctga	tcccacgcaa	agtgtgtaac	ggaataggt	ttggtgaatt	taaagactca	1680
ctctccataa	atgctacgaa	tattaaacac	ttcaaaaact	gcacctccat	cagtggcgat	1740
ctccacatcc	tgccggtggc	atttaggggt	gactccttca	cacatactcc	tcctctggac	1800
ccacaggaac	tggatatctt	gaaaaccgta	aaggaaatca	cagggttttt	gctgattcag	1860
gcttggcctg	aaaacaggac	ggacctccat	gcctttgaga	acctagaaat	catacgcggc	1920
aggaccaagc	aacatggtca	gttttctctt	gcagtcgtca	gcctgaacat	aacatccttg	1980
ggattacgct	ccctcaagga	gataagtgat	ggagatgtga	taatttcagg	aaacaaaaat	2040
ttgtgctatg	caaatacaat	aaactggaaa	aaactgtttg	ggacctccgg	tcagaaaacc	2100
aaaattataa	gcaacagagg	tgaaaacagc	tgcaaggcca	caggccagg	ctgccatgcc	2160
ttgtgctccc	ccgagggtg	ctggggcccg	gagcccagg	actgcgtctc	ttgccggaat	2220
gtcagccgag	gcagggaatg	cgtggacaag	tgcaaccttc	tggagggtga	gccaaaggag	2280
tttgtggaga	actctgagtg	catacagtgc	caccagagtg	gcctgcctca	ggccatgaac	2340
atcacctgca	caggacgggg	accagacaac	tgtatccagt	gtgcccacta	cattgacggc	2400
ccccactgcg	tcaagacctg	cccggcagga	gtcatgggag	aaaacaacac	cctggtcttg	2460
aagtacgcag	acgccggcca	tgtgtgccac	ctgtgccatc	caaactgcac	ctacggatgc	2520
actgggccag	gtcttgaagg	ctgtccaacg	aatgggccta	agatcccgtc	catcgccact	2580
gggatgggtg	gggccctcct	cttgctgctg	gtggtggccc	tggggatcgg	cctcttcatg	2640

tag 2643

<210> 42

<211> 880

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) - tEGFR

<400> 42

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

				245					250					255			
Gly	Asn	Phe	Ala	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val		
				260					265					270			
Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala		
				275					280					285			
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg		
				290					295					300			
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys		
305							310				315				320		
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu		
				325					330					335			
Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu		
				340					345					350			
Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln		
				355					360					365			
Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly		
				370					375					380			
Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr		
385							390				395				400		
Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg		
				405					410					415			
Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met		
				420					425					430			
Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu		
				435					440					445			
Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys		
				450					455					460			
Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu		
465							470				475				480		
Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu		
				485					490					495			
Pro	Pro	Arg	His	Met	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys		
				500					505					510			
Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Leu	Leu	Leu	Val		
				515					520					525			
Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro	Ala	Phe	Leu	Leu	Ile		
				530					535					540			
Pro	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser		
545						550					555				560		

Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser		
565	570	575
Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser		
580	585	590
Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys		
595	600	605
Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu		
610	615	620
Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly		
625	630	635
Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn		
645	650	655
Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp		
660	665	670
Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn		
675	680	685
Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser		
690	695	700
Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala		
705	710	715
Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val		
725	730	735
Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn		
740	745	750
Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile		
755	760	765
Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr		
770	775	780
Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly		
785	790	795
Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn		
805	810	815
Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys		
820	825	830
His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys		
835	840	845
Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly		
850	855	860
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met		

865	870	875	880			
<210>	43					
<211>	1503					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	CCR4 (KW_L2H)					
<400>	43					
atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgctaga	60
cccggatccg	acgtgctgat	gacacagagc	cctctgagcc	tgccctgtgac	acctggcgaa	120
cctgccagca	tcagctgcag	atccagccgg	aacatcgtgc	acatcaacgg	cgacacctac	180
ctggaatggc	atctgcagaa	gcccggccag	tctcctcagc	tgctgatcta	caaggtgtcc	240
aaccggttca	gcggcgtgcc	cgatagattt	tctggcagcg	gctctggcac	cgacttcacc	300
ctgaagatct	ccagagtgga	agccgaggac	gtgggcgtgt	actactgctt	ccaaggctct	360
ctgctgccct	ggacatttgg	ccagggcacc	aaggtggaaa	tcaagggagg	aggtggatca	420
ggtggagggtg	gaagcggggg	aggaggttcc	ggcggcggag	gatcagaagt	tcagctggtt	480
gagtctggcg	gcgacctggt	tcagcctggc	agatctctga	gactgagctg	tgccgccagc	540
ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgccggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgtcgc	agcccctgtc	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccctt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtgag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atg						1503
<210>	44					
<211>	501					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 44

```

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

```

290	295	300	
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys			
305	310	315	320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu			
	325	330	335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu			
	340	345	350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln			
	355	360	365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly			
370	375	380	
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr			
385	390	395	400
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg			
	405	410	415
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met			
	420	425	430
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu			
	435	440	445
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys			
	450	455	460
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu			
465	470	475	480
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu			
	485	490	495
Pro Pro Arg His Met			
500			
<210>	45		
<211>	66		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	P2A		
<400>	45		
ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct			60
ggacct			66
<210>	46		
<211>	22		
<212>	PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 46

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

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 47

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GMSCFR前导

<400> 47

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60

atccca 66

<210> 48

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GMSCFR前导

<400> 48

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

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 49

<211> 1008

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 49

cgcaaagtgt gtaacggaat aggtatttgt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 60

acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg 120

gtggcatttta ggggtgactc cttcacacat actcctctc tggaccaca ggaactggat 180

attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac 240

```

aggacggacc tccatgcctt tgagaacctt gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat    300
ggtcagtttt ctcttgcaat cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc    360
aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaattttgtg ctatgcaaat    420
acaataaaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaact tataagcaac    480
agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag    540
ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg    600
gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct    660
gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga    720
cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggcccccct ctgcgtcaag    780
acctgccccg caggagtcac gggagaaaac aacacctggt tctggaagta cgcagacgcc    840
ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt    900
gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg ccactgggat ggtggggggc    960
ctcctcttgc tgctggtggt ggccctgggg atcggcctct tcatgtag    1008

```

<210> 50

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 50

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

85 90 95

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

130 135 140

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn

145	150	155	160
Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu			
	165	170	175
Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser			
	180	185	190
Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu			
	195	200	205
Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln			
	210	215	220
Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly			
225	230	235	240
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro			
	245	250	255
His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr			
	260	265	270
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His			
	275	280	285
Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro			
	290	295	300
Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala			
305	310	315	320
Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met			
	325	330	335

<210> 51

<211> 2463

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -CD20

<400> 51

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggtct tgctgctgca tgccgctaga	60
cccgatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgctgtgac acctggcgaa	120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac	180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctctcagc tgctgatcta caaggtgtcc	240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc	300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggtctt	360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca	420
ggtggagggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt	480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc	540

ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgctcg	agcccctgtc	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttgga	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagaac	1560
cctggaccta	tgacaacacc	cagaaattca	gtaaattggga	ctttcccggc	agagccaatg	1620
aaaggcccta	ttgctatgca	atctggtcca	aaaccactct	tcaggaggat	gtcttctactg	1680
gtgggcccc	cgcaatcctt	cttcagtagg	gaatctaaga	ctttgggggc	tgtccagatt	1740
atgaatgggc	tcttccacat	tgccctgggg	ggtcttctga	tgatcccagc	agggatctat	1800
gcacccatct	gtgtgactgt	gtggtatcct	ctctggggag	gcattatgta	tattattttcc	1860
ggatcactcc	tggcagcaac	ggagaaaaac	tccaggaagt	gttttgtcaa	aggaaaaatg	1920
ataatgaact	cattgagcct	ctttgctgcc	atttctggaa	tgattctttc	aatcatggac	1980
atacttaata	ttaaaatttc	ccatttttta	aaaatggaga	gtctgaattt	tattagagct	2040
cacacaccat	atattaacat	atacaactgt	gaaccagcta	atccctctga	gaaaaactcc	2100
ccatctaccc	aatactgtta	cagcatacaa	tctctgttct	tgggcatttt	gtcagtgatg	2160
ctgatctttg	ccttcttcca	ggaacttgta	atagctggca	tcgttgagaa	tgaatggaaa	2220
agaacgtgct	ccagacccaa	atctaacata	gttctcctgt	cagcagaaga	aaaaaaagaa	2280
cagactattg	aaataaaaaga	agaagtgggt	gggctaactg	aaacatcttc	ccaaccaaag	2340
aatgaagaag	acattgaaat	tattccaatc	caagaagagg	aagaagaaga	aacagagacg	2400
aactttccag	aacctcccca	agatcaggaa	tcctcaccaa	tagaaaatga	cagctctcct	2460
taa						2463

<210> 52

<211> 820

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -CD20

<400> 52

```

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

```

Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	305	310	315	320
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	325	330	335	
Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	340	345	350	
Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	355	360	365	
Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	370	375	380	
Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	385	390	395	400
Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	405	410	415	
Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	420	425	430	
Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	435	440	445	
Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	450	455	460	
Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	465	470	475	480
Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	485	490	495	
Pro	Pro	Arg	His	Met	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	500	505	510	
Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Thr	Thr	Pro	Arg	515	520	525	
Asn	Ser	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Pro	Ala	Glu	Pro	Met	Lys	Gly	Pro	Ile	530	535	540	
Ala	Met	Gln	Ser	Gly	Pro	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg	Arg	Met	Ser	Ser	Leu	545	550	555	560
Val	Gly	Pro	Thr	Gln	Ser	Phe	Phe	Met	Arg	Glu	Ser	Lys	Thr	Leu	Gly	565	570	575	
Ala	Val	Gln	Ile	Met	Asn	Gly	Leu	Phe	His	Ile	Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	580	585	590	
Leu	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ile	Cys	Val	Thr	Val	Trp	595	600	605	
Tyr	Pro	Leu	Trp	Gly	Gly	Ile	Met	Tyr	Ile	Ile	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu				

610	615	620
Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu Val Lys Gly Lys Met		
625	630	635
Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile Ser Gly Met Ile Leu		
645	650	655
Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met		
660	665	670
Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr		
675	680	685
Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln		
690	695	700
Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser Val Met		
705	710	715
Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile Val Glu		
725	730	735
Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys Ser Asn Ile Val Leu		
740	745	750
Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile Glu Ile Lys Glu Glu		
755	760	765
Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro Lys Asn Glu Glu Asp		
770	775	780
Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu Glu Thr Glu Thr		
785	790	795
Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn		
805	810	815
Asp Ser Ser Pro		
820		

<210> 53

<211> 1503

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 53

atggccctgc ctgtgacagc cctgtctgtg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
cccggatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa	120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac	180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctctcagc tgctgatcta caaggtgtcc	240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc	300

```

ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggctct 360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca 420
ggtggagggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt 480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc 540
ggcttcatct tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac agggccctgg aaaaggactg 600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag 660
ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc 720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc 780
tttggctatt ggggccaggg aaccctggtc accgtttcta gttccggaac cagcagccca 840
gcgccgcgac caccaacacc ggcggcccacc atcgcgctgc agcccctgtc cctgcgcccc 900
gaggcgtgcc ggccagcggc gggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgctgt 960
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt 1020
atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt 1080
atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac 1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1260
gttttggaaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag 1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgccat 1500
atg 1503

```

<210> 54

<211> 501

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 54

```

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

```

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

Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 405 410 415
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 420 425 430
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 435 440 445
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 450 455 460
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 485 490 495
 Pro Pro Arg His Met
 500

<210> 55

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 55

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60

ggacct 66

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 56

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

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 57

<211> 894

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20

<400> 57

```

atgacaacac ccagaaattc agtaaatggg actttcccg cagagccaat gaaaggccct      60
attgctatgc aatctgggtcc aaaaccactc ttcaggagga tgtcttcact ggtgggcccc      120
acgcaatcct tcttcatgag ggaatctaag actttggggg ctgtccagat tatgaatggg      180
ctcttccaca ttgccctggg gggctcttctg atgatcccg cagggatcta tgcacccatc      240
tgtgtgactg tgtgggtatcc tctctgggga ggcattatgt atattatttc cggatcactc      300
ctggcagcaa cggagaaaaa ctccaggaag tgtttggtca aaggaaaaat gataatgaac      360
tcattgagcc tctttgctgc catttctgga atgattcttt caatcatgga catacttaat      420
attaaaaattt cccatttttt aaaaatggag agtctgaatt ttattagagc tcacacacca      480
tatattaaca tatacaactg tgaaccagct aatccctctg agaaaaactc cccatctacc      540
caatactgtt acagcataca atctctgttc ttgggcattt tgtcagtgat gctgatcttt      600
gccttcttcc aggaacttgt aatagctggc atcgttgaga atgaatggaa aagaacgtgc      660
tccagaccca aatctaacat agttctcctg tcagcagaag aaaaaaaga acagactatt      720
gaaataaaaag aagaagtgtt tgggctaact gaaacatctt cccaaccaa gaatgaagaa      780
gacattgaaa ttattccaat ccaagaagag gaagaagaag aaacagagac gaactttcca      840
gaacctcccc aagatcagga atcctcacca atagaaaatg acagctctcc ttaa      894

```

<210> 58

<211> 297

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20

<400> 58

```

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

```

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

<210> 59

<211> 2754

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -FKBP-iCasp9

<400> 59

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
cccgatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgctgtgac acctggcgaa	120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac	180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctctcagc tgctgatcta caaggtgtcc	240
aaccggttca gcggcgtgcc cगतगत्त tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc	300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggtctt	360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca	420
ggaggagggt gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt	480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc	540

ggcttcatct	tcagcaacta	cggcatgagc	tgggtccgac	aggcccctgg	aaaaggactg	600
gaatgggtcg	ccacaatcag	cagcgccagc	acctacagct	actaccccga	tagcgtgaag	660
ggcagattca	ccatcagccg	ggacaacgcc	aagaacagcc	tgtacctgca	gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg	aagatacagc	cctgtactat	tgcggcagac	acagcgacgg	caacttcgcc	780
tttggctatt	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtttcta	gttccggaac	cacgacgcca	840
gcgcccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc	atcgcgctcg	agcccctgtc	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcctgt	960
gatatctaca	tctgggcgcc	cttggccggg	acttgtgggg	tccttctcct	gtcactggtt	1020
atcacccttt	actgcaaacg	gggcagaaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgccat	1500
atgggaagcg	gagctactaa	cttcagcctg	ctgaagcagg	ctggagacgt	ggaggagaac	1560
cctggacctg	gagtgcaggt	ggagactatc	tccccaggag	acgggcgcac	cttccccaaag	1620
cgcggccaga	cctgcgtggt	gcactacacc	gggatgcttg	aagatggaaa	gaaagttgat	1680
tcctcccggg	acagaaacaa	gccctttaag	tttatgctag	gcaagcagga	ggtgatccga	1740
ggctgggaag	aaggggttgc	ccagatgagt	gtgggtcaga	gagccaaact	gactatatct	1800
ccagattatg	cctatggtgc	cactgggcac	ccaggcatca	tcccaccaca	tgccactctc	1860
gtcttcgatg	tggagcttct	aaaactggaa	tctggcggtg	gctccggatt	tggtgatgtc	1920
ggtgctcttg	agagtittgag	gggaaatgca	gatttggctt	acatcctgag	catggagccc	1980
tgtggccact	gcctcattat	caacaatgtg	aacttctgcc	gtgagtccgg	gctccgcacc	2040
cgcactggct	ccaacatcga	ctgtgagaag	ttgcggcgtc	gcttctcctc	gctgcatttc	2100
atggtggagg	tgaaggcgca	cctgactgcc	aagaaaatgg	tgctggcttt	gctggagctg	2160
gcgcggcagg	accacggtgc	tctggactgc	tgcgtggtgg	tcattctctc	tcacggctgt	2220
caggccagcc	acctgcagtt	cccaggggct	gtctacggca	cagatggatg	ccctgtgtcg	2280
gtcgagaaga	ttgtgaacat	cttcaatggg	accagctgcc	ccagcctggg	agggaagccc	2340
aagctctttt	tcatccaggc	ctgtggtggg	gagcagaaag	accatgggtt	tgaggtggcc	2400
tccacttccc	ctgaagacga	gtcccctggc	agtaaccccg	agccagatgc	caccccgttc	2460
caggaagggt	tgaggacctt	cgaccagctg	gacgccatat	ctagtttgcc	cacacccagt	2520
gacatctttg	tgtcctactc	tactttccca	ggttttgttt	cctggaggga	ccccaaagat	2580
ggctcctggt	acgttgagac	cctggacgac	atctttgagc	agtgggctca	ctctgaagac	2640
ctgcagtccc	tcctgcttag	ggtcgctaat	gctgtttcgg	tgaaagggat	ttataaacag	2700
atgcctggtt	gctttaattt	cctccggaaa	aaacttttct	ttaaaacatc	ataa	2754
<210>	60					
<211>	917					

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -FKBP-iCasp9

<400> 60

```

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

```

Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala		
275	280	285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg		
290	295	300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys		
305	310	315
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu		
	325	330
		335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu		
	340	345
		350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln		
	355	360
		365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly		
	370	375
		380
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
385	390	395
		400
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
	405	410
		415
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
	420	425
		430
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		
	435	440
		445
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
	450	455
		460
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		
465	470	475
		480
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
	485	490
		495
Pro Pro Arg His Met Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys		
	500	505
		510
Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Gly Val Gln Val Glu		
	515	520
		525
Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr		
	530	535
		540
Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp		
545	550	555
		560
Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln		
	565	570
		575
Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly		

580	585	590
Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr		
595	600	605
Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val		
610	615	620
Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Gly Phe Gly Asp Val		
625	630	635
Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu		
645	650	655
Ser Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe		
660	665	670
Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys		
675	680	685
Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val		
690	695	700
Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu		
705	710	715
Ala Arg Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu		
725	730	735
Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr		
740	745	750
Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe		
755	760	765
Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe		
770	775	780
Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala		
785	790	795
Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp		
805	810	815
Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala		
820	825	830
Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr		
835	840	845
Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr		
850	855	860
Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp		
865	870	875
Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly		
885	890	895

Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu
 900 905 910

Phe Phe Lys Thr Ser
 915

<210> 61

<211> 1503

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 61

```

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggtct tgctgctgca tgccgctaga      60
cccgatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa      120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac      180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctctcagc tgctgatcta caaggtgtcc      240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc      300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggtctt      360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca      420
ggtggagggt gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt      480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc      540
ggcttcatct tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac aggccctgg aaaaggactg      600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag      660
ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc      720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc      780
tttggctatt ggggccaggg aacctgggtc accgtttcta gttccggaac cagcagcca      840
gcgccgcgac caccaacacc ggcgccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgccc      900
gaggcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttgcctgt      960
gatattctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt     1020
atcaccccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt     1080
atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gtcgccgatt tccagaagaa     1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac      1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat     1260
gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac     1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag     1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc     1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc cctcgccat      1500
atg                                             1503

```

<210> 62

<211> 501

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 62

```

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

```

Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 275 280 285
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 290 295 300
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 305 310 315 320
 Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 325 330 335
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 340 345 350
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 355 360 365
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 370 375 380
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 385 390 395 400
 Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 405 410 415
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 420 425 430
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 435 440 445
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 450 455 460
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 485 490 495
 Pro Pro Arg His Met
 500

<210> 63

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 63

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct
 ggacct

60

66

<210> 64

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 64

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

1

5

10

15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 65

<211> 1185

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> FKBP-iCasp9

<400> 65

```

ggagtgcagg tggagactat ctccccagga gacgggcgca cttccccaa gcgcggccag      60
acctgcgtgg tgcactacac cgggatgctt gaagatggaa agaaagttga ttctctccgg      120
gacagaaaca agccctttaa gtttatgcta ggcaagcagg aggtgatccg aggctgggaa      180
gaaggggttg cccagatgag tgtgggtcag agagccaaac tgactatatc tccagattat      240
gcctatggtg ccactgggca cccaggcatc atcccaccac atgccactct cgtcttcgat      300
gtggagcttc taaaactgga atctggcggt ggctccggat ttggtgatgt cggtgctctt      360
gagagtttga ggggaaatgc agatttggct tacatcctga gcatggagcc ctgtggccac      420
tgccatcatta tcaacaatgt gaacttctgc cgtgagtccg ggctccgcac ccgactggc      480
tccaacatcg actgtgagaa gttgcggcgt cgcttctcct cgctgcattt catggtggag      540
gtgaagggcg acctgactgc caagaaaatg gtgctggctt tgctggagct ggcgcggcag      600
gaccacgggtg ctctggactg ctgcgtggtg gtcattctct ctcacggctg tcaggccagc      660
cacctgcagt tcccaggggc tgtctacggc acagatggat gccctgtgtc ggtcgagaag      720
attgtgaaca tcttcaatgg gaccagctgc cccagcctgg gagggaagcc caagctcttt      780
ttcatccagg cctgtggtgg ggagcagaaa gaccatgggt ttgaggtggc ctccacttcc      840
cctgaagacg agtcccctgg cagtaacccc gagccagatg ccaccccggt ccaggaaggt      900
ttgaggacct tcgaccagct ggacgccata tctagtttgc ccacaccag tgacatcttt      960
gtgtcctact ctactttccc aggttttgtt tcctggaggg accccaagag tggctcctgg     1020
tacgttgaga ccctggacga catctttgag cagtgggctc actctgaaga cctgcagtec     1080
ctcctgctta gggtcgctaa tgctgtttcg gtgaaaggga ttataaaca gatgcctggt     1140
tgctttaatt tcctccggaa aaaacttttc tttaaaacat cataa                       1185

```

<210> 66

<211> 394
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FKBP-iCasp9
 <400> 66
 Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro
 1 5 10 15
 Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp
 20 25 30
 Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe
 35 40 45
 Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala
 50 55 60
 Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr
 85 90 95
 Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp
 115 120 125
 Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile
 130 135 140
 Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly
 145 150 155 160
 Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His
 165 170 175
 Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu
 180 185 190
 Ala Leu Leu Glu Leu Ala Arg Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys
 195 200 205
 Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe
 210 215 220
 Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys
 225 230 235 240
 Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly Lys
 245 250 255
 Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His

260	265	270
Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr	Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser	
275	280	285
Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr	Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr Phe	
290	295	300
Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser	Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe	
305	310	315
Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro	Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys	
325	330	335
Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu	Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp	
340	345	350
Ala His Ser Glu Asp Leu Gln	Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala	
355	360	365
Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr	Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe	
370	375	380
Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe	Lys Thr Ser	
385	390	

<210> 67

<211> 2694

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -HSVTK

<400> 67

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
cccggatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa	120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac	180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc	240
aaccggttca gcggcggtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc	300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggctct	360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaagggagg aggtggatca	420
ggtggaggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt	480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc	540
ggcttcatct tcagcaacta cggcattgagc tgggtccgac aggcccttg aaaaggactg	600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag	660
ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc	780
tttggtattt ggggccaggg aaccctggtc accgtttcta gttccggaac cagcagccca	840
gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcccc	900

```

gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt 960
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttggtggg tccttctcct gtcactggtt 1020
atcaccccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt 1080
atgagaccag tacaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac 1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1260
gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtga 1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgcgga 1500
agcggagcta ctaacttcag cctgctgaag caggctggag acgtggagga gaaccctgga 1560
cctatggctt cgtacccttg ccatcaacac gcgtctgcgt tcgaccaggc tgcgcgttct 1620
cgcggccata gcaaccgacg tacggcgttg cgccctcgcc ggcagcaaga agccacggaa 1680
gtccgcctgg agcagaaaat gcccacgcta ctgcgggttt atatagacgg tcctcacggg 1740
atggggaaaa ccaccaccac gcaactgctg gtggccctgg gttcgcgcga cgatatcgtc 1800
tacgtacccg agccgatgac ttactggcag gtgctggggg cttccgagac aatcgcgaa 1860
atctacacca cacaacaccg cctcgaccag ggcgagatat cggccgggga cgcgcggtg 1920
gtaatgacaa gcgcccagat aacaatgggc atgccttatg ccgtgaccga cgccgttctg 1980
gtcctcatg tcggggggga ggctgggagt tcacatgccc cgcccccgcc cctcacctc 2040
atcttcgacc gccatcccat cgccgcctc ctgtgctacc cgccgcgcg ataccttatg 2100
ggcagcatga cccccaggc cgtgctggcg ttcgtggccc tcatcccgcc gaccttgccc 2160
ggcacaaaca tcgtgttggg ggcccttccg gaggacagac acatcgaccg cctggccaaa 2220
cgccagcgcc ccggcgagcg gcttgacctg gctatgctgg ccgcgattcg ccgcgtttac 2280
gggctgcttg ccaatacggg gcggtatctg cagggcggcg ggtcgtggtg ggaggattgg 2340
ggacagcttt cggggacggc cgtgccgccc cagggtgccg agccccagag caacgcgggc 2400
ccacgacccc atatcgggga cacgttattt accctgtttc gggccccga gttgctggcc 2460
cccaacggcg acctgtataa cgtgtttgcc tgggccttgg acgtcttggc caaacgcctc 2520
cgtcccatgc acgtctttat cctggattac gaccaatcgc ccgccggctg ccgggacgcc 2580
ctgctgcaac ttacctccg gatgttccag acccacgtca ccacccagg ctccataccg 2640
acgatctgcg acctggcgcg cacgtttgcc cgggagatgg gggaggctaa ctaa 2694

```

<210> 68

<211> 897

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -HSVTK

<400> 68

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1

5

10

15

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

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

Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr		
645	650	655
Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly Gly Glu Ala Gly Ser Ser His		
660	665	670
Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile Phe Asp Arg His Pro Ile Ala		
675	680	685
Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr		
690	695	700
Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro		
705	710	715
Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu Pro Glu Asp Arg His Ile Asp		
725	730	735
Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met		
740	745	750
Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg		
755	760	765
Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ser Trp Trp Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser		
770	775	780
Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly		
785	790	795
Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro		
805	810	815
Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala		
820	825	830
Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg Pro Met His Val Phe Ile Leu		
835	840	845
Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu		
850	855	860
Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro		
865	870	875
Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala		
885	890	895

Asn

<210> 69

<211> 1503

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 69

```

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga      60
cccgatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa      120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac      180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc      240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc      300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggctct      360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca      420
ggtggagggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt      480
gagtctggcg gcgacctggg tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc      540
ggcttcatct tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac aggccctgg aaaaggactg      600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag      660
ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc      720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc      780
tttggctatt ggggccaggg aacctgtgtc accgtttcta gttccggaac cagcagcca      840
gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcca      900
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgctgt      960
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt     1020
atcacccctt actgcaaacg gggcagaaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt     1080
atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa     1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac     1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat     1260
gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac     1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag     1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc     1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgccat     1500
atg                                                                 1503

```

<210> 70

<211> 501

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 70

```

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

```

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

Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 355 360 365
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly
 370 375 380
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 385 390 395 400
 Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 405 410 415
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 420 425 430
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 435 440 445
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 450 455 460
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 485 490 495
 Pro Pro Arg His Met
 500

<210> 71

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 71

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct

60

ggacct

66

<210> 72

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 72

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

1

5

10

15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 73

<211> 1131

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HSVTK

<400> 73

```

atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc      60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc      120
cgccctggagc agaaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacgggtc tcacgggatg      180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tctcgtctac      240
gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc      300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggc gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggtg      360
atgacaagcg ccagataaac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttcttggt      420
cctcatgtcg ggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc      480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccggc ccgcgcgata ctttatgggc      540
agcatgaccc ccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttggccggc      600
acaacatcgc tgttgggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc      660
cagcgccccg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg      720
ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattggga      780
cagctttcgg ggacggccgt gccgcccag ggtgccgagc ccagagcaa cgcgggcccc      840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg ccccgagtt gctggcccc      900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgccctg gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt      960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgccc cgggtgccg ggacgccctg     1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca cccaggtc cataccgacg     1080
atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaacta a             1131

```

<210> 74

<211> 376

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HSVTK

<400> 74

```

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

```

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

Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
 355 360 365
 Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
 370 375

<210> 75

<211> 3423

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> dnTGFRII-CCR4(KW_L2H) -HSVTK

<400> 75

atgggtcggg	ggctgctcag	gggcctgtgg	ccgtgcaca	tcgtcctgtg	gacgcgtatc	60
gccagcacga	tcccaccgca	cgttcagaag	tcggatgtgg	aatggaggc	ccagaaagat	120
gaaatcatct	gccccagctg	taataggact	gcccattccac	tgagacatat	taataacgac	180
atgatatgca	ctgacaacaa	cgggtgcagtc	aagtttccac	aactgtgtaa	attttgtgat	240
gtgagatttt	ccacctgtga	caaccagaaa	tcctgcatga	gcaactgcag	catcacctcc	300
atctgtgaga	agccacagga	agtctgtgtg	gctgtatgga	gaaagaatga	cgagaacata	360
acactagaga	cagtttgcca	tgaccccaag	ctcccctacc	atgactttat	tctggaagat	420
gctgcttctc	caaagtgcac	tatgaaggaa	aaaaaaaaagc	ctggtgagac	tttcttcatg	480
tgttcctgta	gctctgatga	gtgcaatgac	aacatcatct	tctcagaaga	atataacacc	540
agcaatcctg	acttggtgct	agtcataatt	caagtgcagc	gcacagcct	cctgccacca	600
ctgggagttg	ccatatctgt	catcatcatc	ttctactgct	accgcgttaa	ccggcagcag	660
aagctgggca	gcggcgaggg	cagaggcagc	ctgctgacct	gcggcgacct	ggaggagaac	720
cccggacctc	tggccctgcc	tgtgacagcc	ctgctgctgc	ctctggctct	gctgctgcat	780
gccgctagac	ccggatccga	cgtgctgatg	acacagagcc	ctctgagcct	gcctgtgaca	840
cctggcgaac	ctgccagcat	cagctgcaga	tccagccgga	acatcgtgca	catcaacggc	900
gacacctacc	tggaatggta	tctgcagaag	cccggccagt	ctcctcagct	gctgatctac	960
aaggtgtcca	accggttcag	cggcgtgccc	gatagatttt	ctggcagcgg	ctctggcacc	1020
gacttcaccc	tgaagatctc	cagagtggaa	gccgaggacg	tgggcgtgta	ctactgcttc	1080
caaggctctc	tgctgccctg	gacatttggc	cagggcacca	aggtggaaat	caagggagga	1140
ggtggatcag	gtggaggtgg	aagcggggga	ggaggttccg	gcggcgaggg	atcagaagtt	1200
cagctggttg	agtctggcgg	cgacctggtt	cagcctggca	gatctctgag	actgagctgt	1260
gccgccagcg	gcttcatctt	cagcaactac	ggcatgagct	gggtccgaca	ggccccctgga	1320
aaaggactgg	aatgggtcgc	cacaatcagc	agcgccagca	cctacagcta	ctaccccgat	1380
agcgtgaagg	gcagattcac	catcagcccg	gacaacgcca	agaacagcct	gtacctgcag	1440
atgaactccc	tgcgctgga	agatacagcc	ctgtactatt	gcggcagaca	cagcgacggc	1500
aacttcgcct	ttggctattg	gggccaggga	accctggtca	ccgtttctag	ttccggaacc	1560
acgacgccag	cgccgcgacc	accaacaccg	gcgcccacca	tcgcgtcgca	gcccctgtcc	1620
ctgcgcccag	aggcgtgccg	gccagcggcg	gggggcgcag	tgacacagag	ggggctggac	1680

ttcgccctgtg	atatctacat	ctgggcgccc	ttggccggga	cttgtggggt	ccttctcctg	1740
tcactggtta	tcaccttta	ctgcaaacgg	ggcagaaaga	aactcctgta	tatattcaaa	1800
caaccattta	tgagaccagt	acaaactact	caagaggaag	atggctgtag	ctgccgattt	1860
ccagaagaag	aagaaggagg	atgtgaactg	agagtgaagt	tcagcaggag	cgcagacgcc	1920
cccgcgtaca	agcagggcca	gaaccagctc	tataacgagc	tcaatctagg	acgaagagag	1980
gagtacgatg	ttttggacaa	gagacgtggc	cgggaccctg	agatgggggg	aaagccgaga	2040
aggaagaacc	ctcaggaagg	cctgtacaat	gaactgcaga	aagataagat	ggcggaggcc	2100
tacagtgaga	ttgggatgaa	aggcgagcgc	cggaggggca	aggggcacga	tggcctttac	2160
cagggctctca	gtacagccac	caaggacacc	tacgacgccc	ttcacatgca	ggccctgccc	2220
cctcgcgga	gcggagctac	taacttcagc	ctgctgaagc	aggctggaga	cgtggaggag	2280
aaccttgga	ctatggcttc	gtacccctgc	catcaacacg	cgtctgcgtt	cgaccaggct	2340
gcgcgttctc	gcggccatag	caaccgacgt	acggcgttgc	gccctcgccg	gcagcaagaa	2400
gccacggaag	tccgcctgga	gcagaaaatg	cccacgtac	tgcgggttta	tatagacggt	2460
cctcacggga	tggggaaaac	caccaccacg	caactgctgg	tggccctggg	ttcgcgcgac	2520
gatatcgtct	acgtacccga	gccgatgact	tactggcagg	tgctgggggc	ttccgagaca	2580
atcgcgaaaca	tctacaccac	acaacaccgc	ctcgaccagg	gcgagatata	ggccggggac	2640
gcggcggttg	taatgacaag	cgcccagata	acaatgggca	tgccttatgc	cgtgaccgac	2700
gccgttcttg	ctcctcatgt	cgggggggag	gctgggagtt	cacatgcccc	gcccccgccc	2760
ctcaccctca	tcttcgaccg	ccatcccatc	gccgcctcc	tgtgctacce	ggccgcgcga	2820
taccttatgg	gcagcatgac	ccccaggcc	gtgctggcgt	tcgtggccct	catcccgccg	2880
accttgcccc	gcacaaacat	cgtgttgggg	gcccttcagg	aggacagaca	catcgaccgc	2940
ctggccaaac	gccagcgccc	cggcgagcgg	cttgacctgg	ctatgctggc	cgcgattcgc	3000
cgcgttttac	ggctgcttgc	caatacgggt	cggatatctgc	agggcggcgg	gtcgtggtgg	3060
gaggattggg	gacagctttc	ggggacggcc	gtgccgcccc	agggtgccga	gccccagagc	3120
aacgcgggcc	cacgacccca	tatcggggac	acgttattta	ccctgtttcg	ggcccccgag	3180
ttgctggccc	ccaacggcga	cctgtataac	gtgtttgcct	gggccttgga	cgtcttggcc	3240
aaacgcctcc	gtcccatgca	cgtctttatc	ctggattacg	accaatcgcc	cgccggctgc	3300
cgggacgccc	tgctgcaact	tacctccggg	atgggtccaga	cccacgtcac	cacccagggc	3360
tccataccga	cgatctgcga	cctggcgcg	acgtttgccc	gggagatggg	ggaggctaac	3420
taa						3423
<210>	76					
<211>	1140					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	dnTGFR11-CCR4(KW_L2H)-HSVTK					
<400>	76					
Met	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Arg
1		5		10		15

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

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

Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu			
																645	650	655
Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp			
																660	665	670
Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu			
																675	680	685
Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile			
																690	695	700
Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr			
																705	710	715
Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met			
																725	730	735
Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu			
																740	745	750
Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Tyr			
																755	760	765
Pro	Cys	His	Gln	His	Ala	Ser	Ala	Phe	Asp	Gln	Ala	Ala	Arg	Ser	Arg			
																770	775	780
Gly	His	Ser	Asn	Arg	Arg	Thr	Ala	Leu	Arg	Pro	Arg	Arg	Gln	Gln	Glu			
																785	790	795
Ala	Thr	Glu	Val	Arg	Leu	Glu	Gln	Lys	Met	Pro	Thr	Leu	Leu	Arg	Val			
																805	810	815
Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Gly	Met	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln	Leu			
																820	825	830
Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Asp	Asp	Ile	Val	Tyr	Val	Pro	Glu	Pro			
																835	840	845
Met	Thr	Tyr	Trp	Gln	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Thr	Ile	Ala	Asn	Ile			
																850	855	860
Tyr	Thr	Thr	Gln	His	Arg	Leu	Asp	Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Ala	Gly	Asp			
																865	870	875
Ala	Ala	Val	Val	Met	Thr	Ser	Ala	Gln	Ile	Thr	Met	Gly	Met	Pro	Tyr			
																885	890	895
Ala	Val	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	His	Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Gly			
																900	905	910
Ser	Ser	His	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Phe	Asp	Arg	His			
																915	920	925
Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	Arg	Tyr	Leu	Met	Gly			
																930	935	940
Ser	Met	Thr	Pro	Gln	Ala	Val	Leu	Ala	Phe	Val	Ala	Leu	Ile	Pro	Pro			

945	950	955	960
Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu Pro Glu Asp Arg			
	965	970	975
His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly Glu Arg Leu Asp			
	980	985	990
Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly Leu Leu Ala Asn			
	995	1000	1005
Thr Val Arg Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ser Trp Trp Glu Asp Trp			
1010	1015	1020	
Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala Glu Pro			
1025	1030	1035	
Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu Phe			
1040	1045	1050	
Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu			
1055	1060	1065	
Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu			
1070	1075	1080	
Arg Pro Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala			
1085	1090	1095	
Gly Cys Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln			
1100	1105	1110	
Thr His Val Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu			
1115	1120	1125	
Ala Arg Thr Phe Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn			
1130	1135	1140	

<210> 77

<211> 666

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> dnTGNbRII

<400> 77

atgggtcggg ggctgctcag gggcctgtgg ccgtgcaca tcgtcctgtg gacgcgtatc	60
gccagcacga tcccaccgca cggtcagaag tcggatgtgg aaatggaggc ccagaaagat	120
gaaatcatct gccccagctg taataggact gcccattcac tgagacatat taataacgac	180
atgatatgca ctgacaacaa cgggtgcagtc aagtttccac aactgtgtaa attttgtgat	240
gtgagatttt ccacctgtga caaccagaaa tcctgcatga gcaactgcag catcacctcc	300
atctgtgaga agccacagga agtctgtgtg gctgtatgga gaaagaatga cgagaacata	360
acactagaga cagtttgcca tgaccccaag ctcccctacc atgactttat tctggaagat	420

gctgcttctc caaagtgcac tatgaaggaa aaaaaaagc ctggtgagac tttcttcatg 480
 tgttcctgta gctctgatga gtgcaatgac aacatcatct tctcagaaga atataacacc 540
 agcaatcctg acttgttgct agtcatatit caagtgcag gcatcagcct cctgccacca 600
 ctgggagttg ccatactctg catcatcatc ttctactgct accgcgttaa ccggcagcag 660
 aagctg 666

<210> 78

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> dnTGNbRII

<400> 78

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

210	215	220	
<210> 79			
<211> 63			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> T2A			
<400> 79			
ggcagcggcg agggcagagg cagcctgctg acctgcggcg acgtggagga gaaccccgga			60
cct			63
<210> 80			
<211> 21			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> T2A			
<400> 80			
Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu			
1 5 10 15			
Glu Asn Pro Gly Pro			
20			
<210> 81			
<211> 1497			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> CCR4(KW_L2H)			
<400> 81			
atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggtctc tgctgctgca tgccgctaga			60
cccggatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgctgtgac acctggcgaa			120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac			180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctctcagc tgctgatcta caaggtgtcc			240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc			300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggctct			360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca			420
ggtggagggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcgccggag gatcagaagt tcagctggtt			480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc			540
ggcttcatct tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac aggcccctgg aaaaggactg			600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccg tagcgtgaag			660

```

ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc      720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgccgcagac acagcgacgg caacttcgcc      780
tttggctatt ggggccaggg aaccctggtc accgtttcta gttccggaac cagcagccca      840
gcgcccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgctcg agcccctgtc cctgcgccca      900
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttgcctgt      960
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt    1020
atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt    1080
atgagaccag tacaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa    1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac    1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat    1260
gttttggaaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac    1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag    1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc    1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttccatgc aggcctgcc ccctcgc      1497

```

<210> 82

<211> 499

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 82

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser

35 40 45

Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr

50 55 60

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser

65 70 75 80

Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

85 90 95

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

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

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

450	455	460	
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu			
465	470	475	480
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu			
	485	490	495
Pro Pro Arg			
<210> 83			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> P2A			
<400> 83			
ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct			60
ggacct			66
<210> 84			
<211> 22			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> P2A			
<400> 84			
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val			
1 5 10 15			
Glu Glu Asn Pro Gly Pro			
20			
<210> 85			
<211> 1131			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HSVTK			
<400> 85			
atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc			60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc			120
cgcttgagc agaaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg			180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tategtctac			240
gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc			300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggc gagatatcgg ccggggacgc ggcggttgta			360

```

atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
cctcatgtcg ggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc 480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccggg ccgcgcgata ccttatgggc 540
agcatgaccc cccaggccgt gctggcggtc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc 600
acaaacatcg tgttgggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc 660
cagcgccccg gcgagcggt tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg 720
ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga 780
cagcttttcgg ggacggccgt gccgcccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggccca 840
cgacccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg ccccgagtt gctggcccc 900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgctgg gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt 960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgccg ccggtgcg ggacgcctg 1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cagtcacca cccaggtc cataccgacg 1080
atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaacta a 1131

```

<210> 86

<211> 376

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HSVTK

<400> 86

```

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

```

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

<210> 87

<211> 3423

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -dnTGFbRII-HSVTK

<400> 87

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
cccggatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa	120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac	180

ctggaatggt atctgcagaa gcccggccag tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc	240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc	300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggctct	360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaagggagg aggtggatca	420
ggtggagggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt	480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc	540
ggcttcatct tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac agggccctgg aaaaggactg	600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag	660
ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc	720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc	780
tttggctatt ggggccaggg aacctgtgtc accgtttcta gttccggaac cagcagcca	840
gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agccctgtc cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttegcctgt	960
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt	1020
atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt	1080
atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa	1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac	1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat	1260
gttttgacaa agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac	1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag	1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc	1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgcgga	1500
agcggagcta ctaacttcag cctgctgaag caggctggag acgtggagga gaaccctgga	1560
cctatgggtc gggggctgct caggggcctg tggccgctgc acatcgtcct gtggacgcgt	1620
atgccagca cgatcccacc gcacgttcag aagtcggatg tggaaatgga ggcccagaaa	1680
gatgaaatca tctgccccag ctgtaatagg actgcccac cactgagaca tattaataac	1740
gacatgatag tcaactgaca caacggtgca gtcaagtttc cacaactgtg taaattttgt	1800
gatgtgagat tttccacctg tgacaaccag aaatcctgca tgagcaactg cagcatcacc	1860
tccatctgtg agaagccaca ggaagtctgt gtggctgtat ggagaaagaa tgacgagaac	1920
ataacactag agacagtttg ccatgacccc aagctccct accatgactt tattctggaa	1980
gatgctgctt ctccaaagtg cattatgaag gaaaaaaaaa agcctggtga gactttcttc	2040
atgtgttcct gtagctctga tgagtgcaat gacaacatca tcttctcaga agaataaac	2100
accagcaatc ctgacttggt gctagtcata tttcaagtga caggcatcag cctcctgcc	2160
ccactgggag ttgccatata tgtcatcatc atcttctact gctaccgcgt taaccggcag	2220
cagaagctgg gcagcggcga gggcagaggc agcctgctga cctgcggcga cgtggaggag	2280
aaccccgac ctatggcttc gtaccctgc catcaacacg cgtctgcgtt cgaccagget	2340
gcgcgttctc gcggccatag caaccgacgt acggcgttgc gccctcgccg gcagcaagaa	2400
gccacggaag tccgctgga gcagaaaatg cccacgtac tgcgggttta tatagacggt	2460
cctcacggga tggggaaaaac caccaccacg caactgctgg tggccctggg ttcgcgcgac	2520

gatatcgtct acgtacccga gccgatgact tactggcagg tgctgggggc ttccgagaca 2580
 atcgcgaaaca tctacaccac acaacaccgc ctcgaccagg gcgagatata ggccggggac 2640
 gcggcggttg taatgacaag cgcccagata acaatgggca tgccttatgc cgtgaccgac 2700
 gccgttcttg ctctcatgt cgggggggag gctgggagtt cacatgcccc gcccccgcc 2760
 ctcaccctca tcttcgaccg ccatcccatc gccgccctcc tgtgctaccc ggccgcgcga 2820
 taccttatgg gcagcatgac cccccaggcc gtgctggcgt tcgtggccct catcccgccg 2880
 accttgcccc gcacaaacat cgtgttgggg gcccttcggg aggacagaca catcgaccgc 2940
 ctggccaaac gccagcgccc cggcgagcgg cttgacctgg ctatgctggc cgcgattcgc 3000
 cgcgttttac ggctgcttgc caatacggtg cggtatctgc agggcgggcg gtcgtggtgg 3060
 gaggattggg gacagctttc ggggacggcc gtgccgcccc aggggtgccga gccccagagc 3120
 aacgcgggcc cacgacccca tatcggggac acgttattta cctgttttcg gccccccgag 3180
 ttgctggccc ccaacggcga cctgtataac gtgtttgcct gggccttgga cgtcttggcc 3240
 aaacgcctcc gtcccatgca cgtctttatc ctggattacg accaatcgcc cgccggtgc 3300
 cgggacgccc tgctgcaact tacctccggg atggtccaga cccacgtcac cccccaggc 3360
 tccataccga cgatctgcga cctggcgcg cagtttgccc gggagatggg ggaggctaac 3420
 taa 3423

<210> 88

<211> 1140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H) -dnTGFbRII-HSVTK

<400> 88

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
130	135	140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val		
145	150	155
Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser		
	165	170
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val		
	180	185
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser		
	195	200
Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr		
	210	215
Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser		
225	230	235
Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp		
	245	250
Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
	260	265
Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala		
	275	280
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg		
	290	295
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys		
305	310	315
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu		
	325	330
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu		
	340	345
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln		
	355	360
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly		
	370	375
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
385	390	395
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
	405	410
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
	420	425
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		

435	440	445
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
450	455	460
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		
465	470	475
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
485	490	495
Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala		
500	505	510
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg		
515	520	525
Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr		
530	535	540
Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys		
545	550	555
Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg		
565	570	575
His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys		
580	585	590
Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp		
595	600	605
Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu		
610	615	620
Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn		
625	630	635
Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp		
645	650	655
Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys		
660	665	670
Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu		
675	680	685
Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro		
690	695	700
Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro		
705	710	715
Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg		
725	730	735
Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu		
740	745	750

Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Ser Tyr		
755	760	765
Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala Ala Arg Ser Arg		
770	775	780
Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg Arg Gln Gln Glu		
785	790	795
Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr Leu Leu Arg Val		
	805	810
		815
Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr Thr Thr Gln Leu		
	820	825
		830
Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr Val Pro Glu Pro		
	835	840
		845
Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr Ile Ala Asn Ile		
	850	855
		860
Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile Ser Ala Gly Asp		
865	870	875
		880
Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met Gly Met Pro Tyr		
	885	890
		895
Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly Gly Glu Ala Gly		
	900	905
		910
Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile Phe Asp Arg His		
	915	920
		925
Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg Tyr Leu Met Gly		
	930	935
		940
Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala Leu Ile Pro Pro		
945	950	955
		960
Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu Pro Glu Asp Arg		
	965	970
		975
His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly Glu Arg Leu Asp		
	980	985
		990
Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly Leu Leu Ala Asn		
	995	1000
		1005
Thr Val Arg Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ser Trp Trp Glu Asp Trp		
	1010	1015
		1020
Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala Glu Pro		
	1025	1030
		1035
Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu Phe		
	1040	1045
		1050
Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu		

1055	1060	1065
Tyr Asn Val Phe Ala Trp	Ala Leu Asp Val Leu	Ala Lys Arg Leu
1070	1075	1080
Arg Pro Met His Val Phe	Ile Leu Asp Tyr Asp	Gln Ser Pro Ala
1085	1090	1095
Gly Cys Arg Asp Ala Leu	Leu Gln Leu Thr Ser	Gly Met Val Gln
1100	1105	1110
Thr His Val Thr Thr Pro	Gly Ser Ile Pro Thr	Ile Cys Asp Leu
1115	1120	1125
Ala Arg Thr Phe Ala Arg	Glu Met Gly Glu Ala	Asn
1130	1135	1140
<210> 89		
<211> 1497		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CCR4(KW_L2H)		
<400> 89		
atggccctgc ctgtgacagc cctgtctgtg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga		60
cccggatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa		120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac		180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc		240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc		300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggctct		360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca		420
ggtggagggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt		480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc		540
ggcttcatct tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac aggccctgg aaaaggactg		600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag		660
ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc		720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc		780
tttggctatt ggggccaggg aacctgtgtc accgtttcta gttccggaac cagcagcca		840
gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgctgcgc agcccctgtc cctgcgccc		900
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt		960
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt		1020
atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt		1080
atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa		1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac		1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat		1260

```

gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac      1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag      1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc      1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgc      1497
<210> 90
<211> 499
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CCR4(KW_L2H)
<400> 90
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15
His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu
20          25          30
Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
35          40          45
Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr
50          55          60
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser
65          70          75          80
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
85          90          95
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
100         105         110
Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln
115         120         125
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130         135         140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
145         150         155         160
Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser
165         170         175
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val
180         185         190
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser
195         200         205
Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
210         215         220

```

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser			
225	230	235	240
Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp			
	245	250	255
Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val			
	260	265	270
Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala			
	275	280	285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg			
	290	295	300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys			
305	310	315	320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu			
	325	330	335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu			
	340	345	350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln			
	355	360	365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly			
	370	375	380
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr			
385	390	395	400
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg			
	405	410	415
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met			
	420	425	430
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu			
	435	440	445
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys			
	450	455	460
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu			
465	470	475	480
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu			
	485	490	495
Pro Pro Arg			
<210>	91		
<211>	66		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		

<220>	
<223>	P2A
<400>	91
ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct	60
ggacct	66
<210>	92
<211>	22
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	P2A
<400>	92
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val	
1 5 10 15	
Glu Glu Asn Pro Gly Pro	
20	
<210>	93
<211>	666
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	dnTGNbRII
<400>	93
atgggtcggg ggctgctcag gggcctgtgg ccgctgcaca tcgtcctgtg gacgcgtatc	60
gccagcacga tcccaccgca cgttcagaag tcggatgtgg aaatggaggc ccagaaagat	120
gaaatcatct gccccagctg taataggact gcccattccac tgagacatat taataacgac	180
atgatagtca ctgacaacaa cgggtgcagtc aagtttccac aactgtgtaa attttctgat	240
gtgagatttt ccacctgtga caaccagaaa tctgcatga gcaactgcag catcacctcc	300
atctgtgaga agccacagga agtctgtgtg gctgtatgga gaaagaatga cgagaacata	360
acactagaga cagtttgcca tgacccaag ctcccctacc atgactttat tctggaagat	420
gctgcttctc caaagtgcac tatgaaggaa aaaaaaagc ctggtgagac tttcttcatg	480
tgttcctgta gctctgatga gtgcaatgac aacatcatct tctcagaaga atataacacc	540
agcaatcctg acttggtgct agtcatatct caagtacag gcatcagcct cctgccacca	600
ctgggagttg ccatactctgt catcatcatc ttctactgct accgcgttaa ccggcagcag	660
aagctg	666
<210>	94
<211>	222
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>

<223> dnTGNbRII

<400> 94

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp
20 25 30

Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn
35 40 45

Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
50 55 60

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
65 70 75 80

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
85 90 95

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
100 105 110

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
115 120 125

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
130 135 140

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
145 150 155 160

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
165 170 175

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val
180 185 190

Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile
195 200 205

Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu
210 215 220

<210> 95

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 95

ggcagcggcg agggcagagg cagcctgctg acctgcggcg acgtggagga gaaccccgga

60

cct	63
<210> 96	
<211> 21	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> T2A	
<400> 96	
Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu	
1 5 10 15	
Glu Asn Pro Gly Pro	
20	
<210> 97	
<211> 1131	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HSVTK	
<400> 97	
atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc	60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc	120
cgcttgagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg	180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac	240
gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc	300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggc gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta	360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttctggct	420
cctcatgtcg ggggggaggc tgggagttca catgccccgc cccgggccct caccctcatc	480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccggc ccgcgcgata ctttatgggc	540
agcatgaccc cccaggccgt gctggcggtc gtggccctca tcccggcgac cttgcccggc	600
acaaacatcg tgttgggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc	660
cagcgccccg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg	720
ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcggtt cgtggtggga ggattgggga	780
cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc	840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg ccccgagtt gctggcccc	900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgcttg gccttgacg tcttgccaa acgcctccgt	960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccc ccggtgccg ggacgcctg	1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtacca cccaggtc cataccgacg	1080
atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaacta a	1131
<210> 98	

<211> 376
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HSVTK
 <400> 98
 Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
 20 25 30
 Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
 35 40 45
 Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
 50 55 60
 Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
 65 70 75 80
 Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
 85 90 95
 Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
 100 105 110
 Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
 115 120 125
 Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
 130 135 140
 Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile
 145 150 155 160
 Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg
 165 170 175
 Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala
 180 185 190
 Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu
 195 200 205
 Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly
 210 215 220
 Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ser Trp Trp
 245 250 255
 Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala

260	265	270
Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly	Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu	
275	280	285
Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro	Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu	
290	295	300
Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala	Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg	
305	310	315
Pro Met His Val Phe Ile Leu	Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys	
325	330	335
Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu	Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val	
340	345	350
Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro	Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe	
355	360	365
Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala	Asn	
370	375	
<210>	99	
<211>	3423	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CCR4(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFbRII	
<400>	99	
atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga		60
cccggatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa		120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac		180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc		240
aaccggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc		300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggctct		360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaagggagg aggtggatca		420
ggtggaggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt		480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc		540
ggcttcatct tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac aggcccctgg aaaaggactg		600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag		660
ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc		720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc		780
tttggctatt ggggccaggg aacctgtgtc accgtttcta gttccggaac cagcagcca		840
gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgctcgc agcccctgtc cctgcgcca		900
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgctgt		960
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt		1020

atcaccccttt	actgcaaacg	gggcagaaaag	aaactcctgt	atatattcaa	acaaccattt	1080
atgagaccag	tacaaactac	tcaagaggaa	gatggctgta	gctgccgatt	tccagaagaa	1140
gaagaaggag	gatgtgaact	gagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac	1200
aagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat	1260
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac	1320
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagttag	1380
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccagggtctc	1440
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgcgga	1500
agcggagcta	ctaacttcag	cctgctgaag	caggtgagg	acgtggagga	gaaccctgga	1560
cctatggctt	cgtacccttg	ccatcaacac	gcgtctgcgt	tcgaccaggc	tgcgcgttct	1620
cgcggccata	gcaaccgacg	tacggcgttg	cgccctcgcc	ggcagcaaga	agccacggaa	1680
gtccgcctgg	agcagaaaaat	gcccacgcta	ctgcgggttt	atatagacgg	tcctcacggg	1740
atggggaaaa	ccaccaccac	gcaactgctg	gtggccctgg	gttcgcgcga	cgatatcgtc	1800
tacgtacccg	agccgatgac	ttactggcag	gtgctggggg	cttcgagac	aatcgcgaa	1860
atctacacca	cacaacaccg	cctcgaccag	ggcgagatat	cggccgggga	cgcggcggtg	1920
gtaatgacaa	gcgcccagat	aacaatgggc	atgccttatg	ccgtgaccga	cgccgttctg	1980
gtcctcatg	tcggggggga	ggctgggagt	tcacatgccc	cgcccccgcc	cctcacctc	2040
atcttcgacc	gccatcccat	cgccgcctc	ctgtgctacc	cggccgcgcg	ataccttatg	2100
ggcagcatga	ccccccaggc	cgtgctggcg	ttcgtggccc	tcatcccgcc	gaccttgccc	2160
ggcacaaa	tcgtgttggg	ggcccttccg	gaggacagac	acatcgaccg	cctggccaaa	2220
cgccagcgcc	ccggcgagcg	gcttgacctg	gctatgctgg	ccgcgattcg	ccgcgtttac	2280
gggctgcttg	ccaatacggg	gcggtatctg	caggcgggcg	ggtcgtggtg	ggaggattgg	2340
ggacagcttt	cggggacggc	cgtgccgccc	cagggtgccg	agccccagag	caacgcgggc	2400
ccacgacccc	atatcgggga	cacgttattt	accctgtttc	gggcccccca	gttgctggcc	2460
cccaacggcg	acctgtataa	cgtgtttgcc	tgggccttgg	acgtcttggc	caaacgcctc	2520
cgtcccatgc	acgtctttat	cctggattac	gaccaatcgc	ccgccggctg	ccgggacgcc	2580
ctgctgcaac	ttacctccgg	gatgttccag	accacgtca	ccaccccagg	ctccataccg	2640
acgatctgcg	acctggcgcg	cacgtttgcc	cgggagatgg	gggaggctaa	cggcagcggc	2700
gagggcagag	gcagcctgct	gacctgcggc	gacgtggagg	agaaccccgg	acctatgggt	2760
cgggggctgc	tcaggggcct	gtggccgctg	cacatcgctc	tgtggacgcg	tatcgccagc	2820
acgatccccc	cgcacgttca	gaagtcggat	gtggaaatgg	aggcccagaa	agatgaaatc	2880
atctgcccc	gctgtaatag	gactgccc	ccactgagac	atattaataa	cgacatgata	2940
gtcactgaca	acaacgggtg	agtcaagttt	ccacaactgt	gtaaattttg	tgatgtgaga	3000
ttttccacct	gtgacaacca	gaaatcctgc	atgagcaact	gcagcatcac	ctccatctgt	3060
gagaagccac	aggaagtctg	tgtggctgta	tggagaaaga	atgacgagaa	cataacacta	3120
gagacagttt	gccatgaccc	caagtccccc	tacatgact	ttattctgga	agatgctgct	3180
tctccaaagt	gcattatgaa	ggaaaaaaaa	aagcctgggtg	agactttctt	catgtgttcc	3240
tgtagctctg	atgagtgcaa	tgacaacatc	atcttctcag	aagaatataa	caccagcaat	3300
cctgacttgt	tgctagtc	atttcaagt	acaggcatca	gcctcctgcc	accactggga	3360

```

gttgccatat ctgtcatcat catcttctac tgctaccgcg ttaaccggca gcagaagctg      3420
taa                                                                    3423
<210> 100
<211> 1140
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CCR4(KW_L2H) -HSVTK-dnTGFbRII
<400> 100
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1          5          10          15
His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu
          20          25          30
Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
          35          40          45
Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr
          50          55          60
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser
65          70          75          80
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
          85          90          95
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
          100         105         110
Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln
          115         120         125
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
          130         135         140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
145         150         155         160
Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser
          165         170         175
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val
          180         185         190
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser
          195         200         205
Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
          210         215         220
Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
225         230         235         240

```

Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp		
245	250	255
Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
260	265	270
Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala		
275	280	285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg		
290	295	300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys		
305	310	315
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu		
325	330	335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu		
340	345	350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln		
355	360	365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly		
370	375	380
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
385	390	395
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
405	410	415
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
420	425	430
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		
435	440	445
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
450	455	460
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		
465	470	475
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
485	490	495
Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala		
500	505	510
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Ser Tyr Pro Cys His		
515	520	525
Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala Ala Arg Ser Arg Gly His Ser		
530	535	540
Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu		

545	550	555	560
Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp		
565	570	575	
Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala		
580	585	590	
Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr Val	Pro Glu Pro Met Thr Tyr		
595	600	605	
Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr Ile	Ala Asn Ile Tyr Thr Thr		
610	615	620	
Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile Ser	Ala Gly Asp Ala Ala Val		
625	630	635	640
Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met Gly	Met Pro Tyr Ala Val Thr		
645	650	655	
Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly Gly	Glu Ala Gly Ser Ser His		
660	665	670	
Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile Phe	Asp Arg His Pro Ile Ala		
675	680	685	
Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg Tyr	Leu Met Gly Ser Met Thr		
690	695	700	
Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala Leu	Ile Pro Pro Thr Leu Pro		
705	710	715	720
Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu Pro	Glu Asp Arg His Ile Asp		
725	730	735	
Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly Glu	Arg Leu Asp Leu Ala Met		
740	745	750	
Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly Leu	Leu Ala Asn Thr Val Arg		
755	760	765	
Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ser Trp Trp Glu	Asp Trp Gly Gln Leu Ser		
770	775	780	
Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala Glu	Pro Gln Ser Asn Ala Gly		
785	790	795	800
Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu Phe	Thr Leu Phe Arg Ala Pro		
805	810	815	
Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu Tyr	Asn Val Phe Ala Trp Ala		
820	825	830	
Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg Pro	Met His Val Phe Ile Leu		
835	840	845	
Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys Arg	Asp Ala Leu Leu Gln Leu		
850	855	860	

Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro			
865	870	875	880
Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala			
	885	890	895
Asn Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val			
	900	905	910
Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp			
	915	920	925
Pro Leu His Ile Val Leu Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro			
	930	935	940
His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile			
945	950	955	960
Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn			
	965	970	975
Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln			
	980	985	990
Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys			
	995	1000	1005
Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro			
	1010	1015	1020
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile			
	1025	1030	1035
Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp			
	1040	1045	1050
Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu			
	1055	1060	1065
Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser			
	1070	1075	1080
Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr			
	1085	1090	1095
Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile			
	1100	1105	1110
Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile			
	1115	1120	1125
Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu			
	1130	1135	1140
<210>	101		
<211>	1497		
<212>	DNA		

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 101

```

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga      60
cccggatccg acgtgctgat gacacagagc cctctgagcc tgccctgtgac acctggcgaa      120
cctgccagca tcagctgcag atccagccgg aacatcgtgc acatcaacgg cgacacctac      180
ctggaatggg atctgcagaa gcccggccag tctcctcagc tgctgatcta caaggtgtcc      240
aaccgggttca gcggcgtgcc cgatagattt tctggcagcg gctctggcac cgacttcacc      300
ctgaagatct ccagagtgga agccgaggac gtgggcgtgt actactgctt ccaaggctct      360
ctgctgccct ggacatttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaggagg aggtggatca      420
ggtggaggtg gaagcggggg aggaggttcc ggcggcggag gatcagaagt tcagctggtt      480
gagtctggcg gcgacctggt tcagcctggc agatctctga gactgagctg tgccgccagc      540
ggcttcatct tcagcaacta cggcatgagc tgggtccgac aggcccttg aaaaggactg      600
gaatgggtcg ccacaatcag cagcgccagc acctacagct actaccccga tagcgtgaag      660
ggcagattca ccatcagccg ggacaacgcc aagaacagcc tgtacctgca gatgaactcc      720
ctgcgcgtgg aagatacagc cctgtactat tgcggcagac acagcgacgg caacttcgcc      780
tttggctatt ggggccaggg aaccctggtc accgtttcta gttccggaac cagcagcca      840
gcgccgcgac caccaacacc ggcgccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgccc      900
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt      960
gatatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt     1020
atcacccctt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt     1080
atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa     1140
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac      1200
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat      1260
gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac      1320
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtga      1380
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc      1440
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgc      1497

```

<210> 102

<211> 499

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CCR4(KW_L2H)

<400> 102

```

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

```

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

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 340 345 350
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 355 360 365
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly
 370 375 380
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 385 390 395 400
 Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 405 410 415
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 420 425 430
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 435 440 445
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 450 455 460
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 485 490 495

Pro Pro Arg

<210> 103

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 103

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggtg gagacgtgga ggagaaccct

60

ggacct

66

<210> 104

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 104

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

1

5

10

15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 105

<211> 1128

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HSVTK

<400> 105

```

atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc      60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgcgc ctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc      120
cgcttgagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg      180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tategtctac      240
gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc      300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggc gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggtta      360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttcttggt      420
cctcatgtcg ggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc      480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccggc ccgcgcgata ctttatgggc      540
agcatgaccc cccaggccgt gctggcggtc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc      600
acaaacatcg tgttgggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc      660
cagcgccccg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg      720
ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga      780
cagctttcgg ggacggccgt gccgcccag gtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc      840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg ccccgagtt gctggcccc      900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgcctgg gccttgagc tcttggccaa acgcctccgt      960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgccc cggctgccg ggacgccctg     1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cagtcacca cccaggctc cataccgacg     1080
atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaac      1128

```

<210> 106

<211> 376

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HSVTK

<400> 106

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

20 25 30

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

340	345	350
Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr	Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe	
355	360	365
Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn		
370	375	
<210>	107	
<211>	63	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	T2A	
<400>	107	
ggcagcggcg agggcagagg cagcctgctg acctgcggcg acgtggagga gaacccccgga		60
cct		63
<210>	108	
<211>	21	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	T2A	
<400>	108	
Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu		
1	5	10
15		
Glu Asn Pro Gly Pro		
20		
<210>	109	
<211>	669	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	dnTGNbRII	
<400>	109	
atgggtcggg ggctgctcag gggcctgtgg ccgtgcaca tcgtcctgtg gacgcgtatc		60
gccagcacga tcccaccgca cgttcagaag tcggatgtgg aaatggaggc ccagaaagat		120
gaaatcatct gccccagctg taataggact gcccattcac tgagacatat taataacgac		180
atgatatgca ctgacaacaa cgggtgcagtc aagtttccac aactgtgtaa attttgtgat		240
gtgagatttt ccacctgtga caaccagaaa tcctgcatga gcaactgcag catcacctcc		300
atctgtgaga agccacagga agtctgtgtg gctgtatgga gaaagaatga cgagaacata		360
acactagaga cagtttgcca tgaccccaag ctcccctacc atgactttat tctggaagat		420

```

gctgcttctc caaagtgcac tatgaaggaa aaaaaaagc ctggtgagac tttcttcatg      480
tgttcctgta gctctgatga gtgcaatgac aacatcatct tctcagaaga atataacacc      540
agcaatcctg acttgttgct agtcatatit caagtgcagc gcatcagcct cctgccacca      600
ctgggagttg ccatactctg catcatcatc ttctactgct accgcgttaa ccggcagcag      660
aagctgtaa                                         669
<210> 110
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> dnTGNbRII
<400> 110
Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
1           5           10           15
Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp
           20           25           30
Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn
           35           40           45
Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
           50           55           60
Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
65           70           75           80
Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
           85           90           95
Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
           100          105          110
Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
           115          120          125
Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
           130          135          140
Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
145          150          155          160
Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
           165          170          175
Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val
           180          185          190
Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile
           195          200          205
Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu

```

210	215	220	
<210>	111		
<211>	357		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CCR4(KW_L2H) VH链		
<400>	111		
gaagttcagc	tggttgagtc	tggcggcgac	ctggttcagc
ctggcagatc	tctgagactg		60
agctgtgccg	ccagcggcctt	catcttcagc	aactacggca
tgagctgggt	ccgacaggcc		120
cctggaaaag	gactggaatg	ggtcgccaca	atcagcagcg
ccagcaccta	cagctactac		180
cccgatagcg	tgaagggcag	attcaccatc	agccgggaca
acgccaagaa	cagcctgtac		240
ctgcagatga	actccctgcg	cgtggaagat	acagccctgt
actattgcgg	cagacacagc		300
gacggcaact	tcgcctttgg	ctattggggc	cagggaaccc
tggtcacctg	ttctagt		357
<210>	112		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CCR4(KW_L2H) VH链		
<400>	112		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210>	113		
<211>	336		

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CCR4(KW_L2H) VL链	
<400>	113	
	gacgtgctga tgacacagag ccctctgagc ctgcctgtga cacctggcga acctgccagc	60
	atcagctgca gatccagccg gaacatcgtg cacatcaacg gcgacaccta cctggaatgg	120
	tatctgcaga agccccggcca gtctcctcag ctgctgatct acaagggtgtc caaccggttc	180
	agcggcgtgc ccgatatgatt ttctggcagc ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc	240
	tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgct tccaaggctc tctgctgccc	300
	tggacatttg gccagggcac caaggtggaa atcaag	336
<210>	114	
<211>	112	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CCR4(KW_L2H) VL链	
<400>	114	
	Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
	1 5 10 15	
	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile	
	20 25 30	
	Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
	35 40 45	
	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
	50 55 60	
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
	65 70 75 80	
	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	
	85 90 95	
	Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100 105 110	
<210>	115	
<211>	5	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	GS连接体	
<220>		

<221> REPEAT
<222> (1) .. (5)
<223> 序列重复N次, 其中N = 至少为1的整数.
<400> 115
Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 116
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GS连接体
<220>
<221> REPEAT
<222> (1) .. (4)
<223> 序列重复N次, 其中N = 至少为1的整数.
<400> 116
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 117
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GS连接体
<220>
<221> REPEAT
<222> (1) .. (5)
<223> 序列重复N次, 其中N = 至少为1的整数.
<400> 117
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 118
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GS连接体
<400> 118

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 119

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GS连接体

<400> 119

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

<210> 120

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GS连接体

<400> 120

Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

<210> 121

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GS连接体

<400> 121

Gly Ser Gly Gly Gly

1

5

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GS连接体

<400> 122

Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

<210> 123

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 弗林蛋白酶切割位点
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa是任意天然存在的氨基酸
<400> 127
Arg Xaa Lys Arg
1
<210> 128
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 弗林蛋白酶切割位点
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa是任意天然存在的氨基酸
<400> 128
Arg Xaa Arg Arg
1
<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 弗林蛋白酶切割位点
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa是Lys或Arg
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa是任意天然存在的氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)
<223> Xaa是Lys或Arg
<400> 129
Xaa Arg Xaa Xaa Arg
1 5
<210> 130
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 弗林蛋白酶切割位点
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa是任意天然存在的氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa是任意天然存在的氨基酸
<400> 130
Arg Xaa Xaa Arg
1
<210> 131
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 弗林蛋白酶切割位点
<400> 131
Arg Gln Lys Arg
1
<210> 132
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链
<400> 132
Asp Lys Thr His Thr

1	5
<210>	133
<211>	4
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	铰链
<400>	133
Cys Pro Pro Cys	
1	
<210>	134
<211>	15
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	铰链
<400>	134
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg	
1	5 10 15
<210>	135
<211>	12
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	铰链
<400>	135
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr	
1	5 10
<210>	136
<211>	10
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	铰链
<400>	136
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	
1	5 10
<210>	137
<211>	7

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链
<400> 137
Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro
1 5
<210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链
<400> 138
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
1 5
<210> 139
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链
<400> 139
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
<210> 140
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链
<400> 140
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10
<210> 141
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223>	铰链		
<400>	141		
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys			
1	5	10	15
Pro			
<210>	142		
<211>	12		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	铰链		
<400>	142		
Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln			
1	5	10	
<210>	143		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	铰链		
<400>	143		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Tyr Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
1	5	10	15
<210>	144		
<211>	67		
<212>	RNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	sh-CCR4#1		
<400>	144		
gaaugaaguu guagguaaua ucugugaagc cacagauggg auauuaccua caacucauu			60
cuuuuuuu			67
<210>	145		
<211>	67		
<212>	RNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	sh-CCR4#2		
<400>	145		

gcaugaguca gucugaugag acugugaagc cacagauggg ucucaucaga cugacucaug	60
cuuuuuu	67
<210> 146	
<211> 67	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> sh-CCR4#3	
<400> 146	
gcugauggag uaaaucgcua ccugugaagc cacagauggg guagcgauuu acuccaucag	60
cuuuuuu	67
<210> 147	
<211> 67	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> sh-CCR4#4	
<400> 147	
guuguaggua auauugcaag gcugugaagc cacagauggg ccuugcaaua uuaccuacaa	60
cuuuuuu	67
<210> 148	
<211> 67	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> sh-Cre	
<400> 148	
gauuuacggc gcuaaggaug acugugaagc cacagauggg ucauccuuag cgccguaaa	60
cuuuuuu	67
<210> 149	
<211> 67	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 编码sh-CCR4#1的DNA	
<400> 149	
gaatgaagtt gtaggtaata tctgtgaagc cacagatggg atattaccta caacttcatt	60
ctttttt	67
<210> 150	

<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码sh-CCR4#2的DNA	
<400>	150	
gcatgagtca gtctgatgag actgtgaagc cacagatggg tctcatcaga ctgactcatg		60
cttttttt		67
<210>	151	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码sh-CCR4#3的DNA	
<400>	151	
gctgatggag taaatcgcta cctgtgaagc cacagatggg gtagcgattt actccatcag		60
cttttttt		67
<210>	152	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码sh-CCR4#4的DNA	
<400>	152	
gttgtaggta atattgcaag gctgtgaagc cacagatggg ccttgcaata ttacctacaa		60
cttttttt		67
<210>	153	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码sh-Cre的DNA	
<400>	153	
gattttacggc gctaaggatg actgtgaagc cacagatggg tcatccttag cgccgtaa		60
cttttttt		67

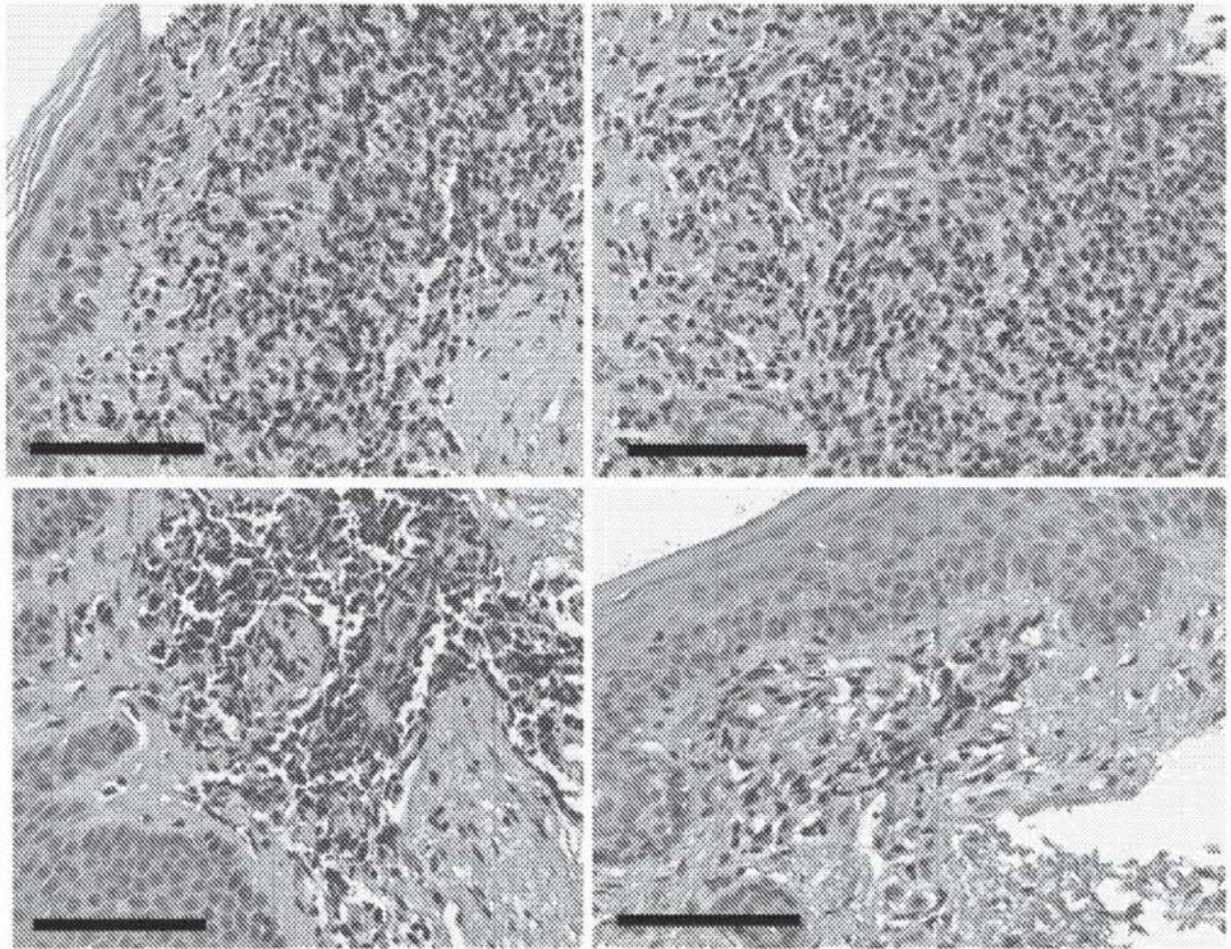
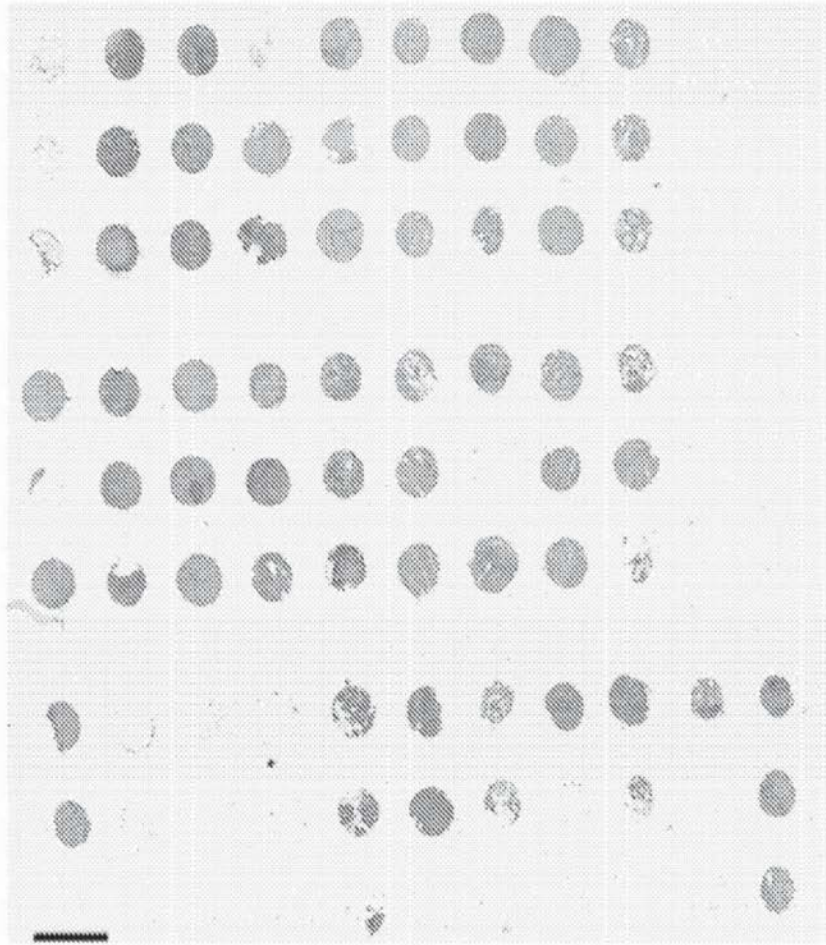


图1



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	脂肪	胸腺	脾	乳腺	甲状腺	肝	阑尾	前列腺	睾丸		
2	脂肪	胸腺	脾	乳腺	甲状腺	肝	阑尾	前列腺	睾丸		
3	脂肪	胸腺	脾	乳腺	甲状腺	肝	阑尾	前列腺	睾丸		
4	肌肉	脊髓	淋巴	卵巢	甲状旁腺	心脏	食管	肾上腺	结肠		
5	肌肉	脊髓	淋巴	卵巢	甲状旁腺	心脏	食管	肾上腺	结肠		
6	肌肉	脊髓	淋巴	卵巢	甲状旁腺	心脏	食管	肾上腺	结肠		
7	小脑	小脑	子宫内膜	胎盘	唾液	胰腺	肺	肾	胃	子宫颈	子宫颈
8	小脑	小脑	子宫内膜	胎盘	唾液	胰腺	肺	肾	胃	子宫颈	子宫颈
9	小脑	小脑	子宫内膜	胎盘	唾液	胰腺	肺	肾	胃	子宫颈	子宫颈

图2

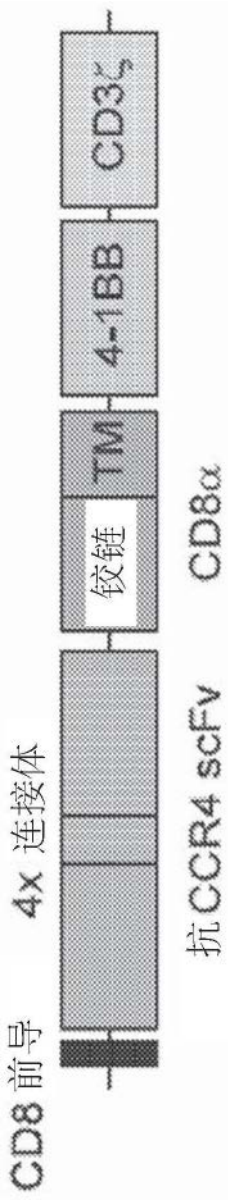


图3

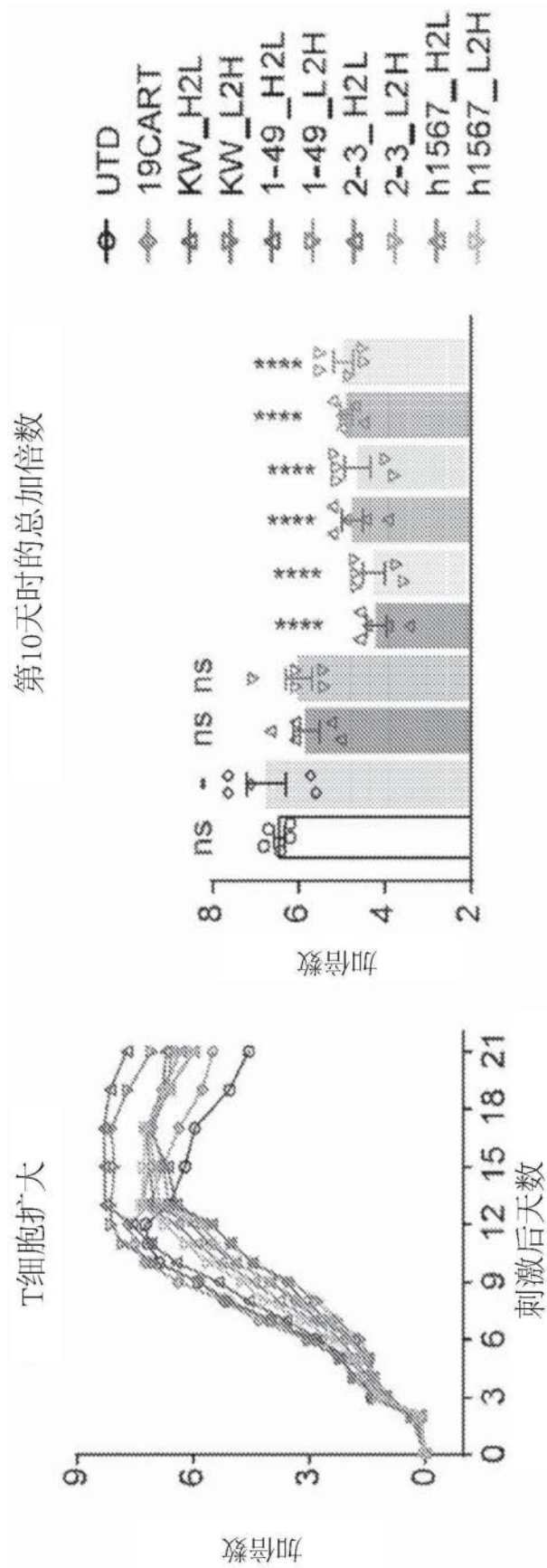


图4

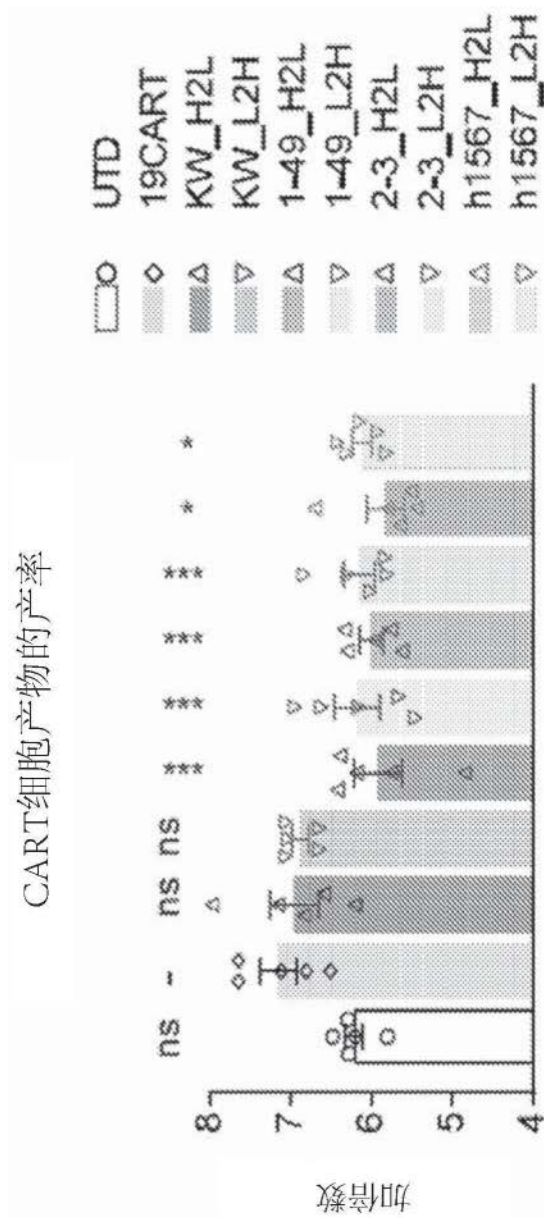


图5

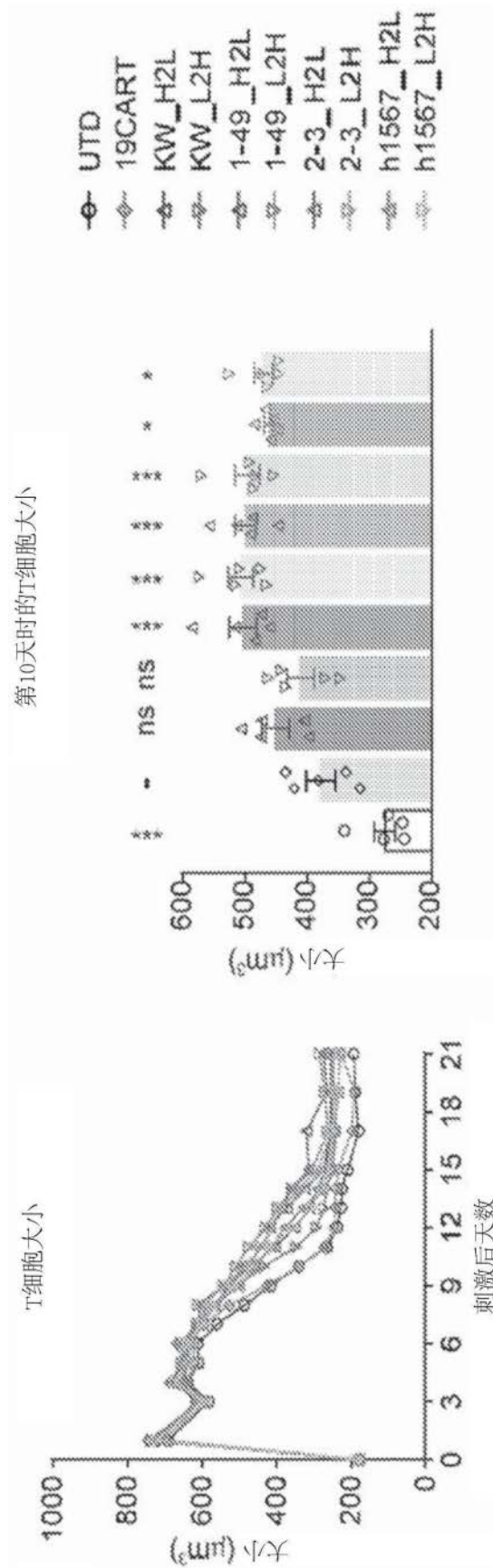


图6

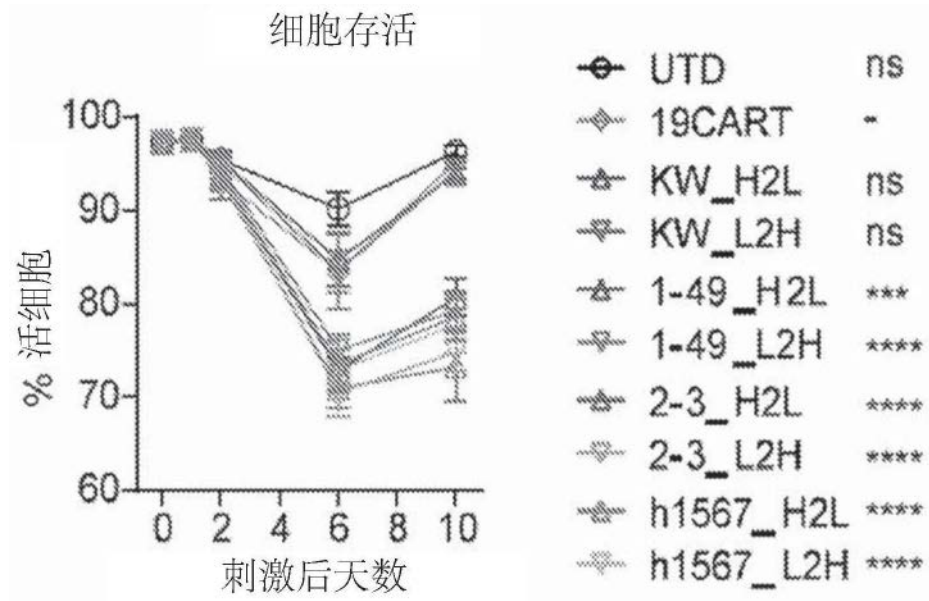


图7

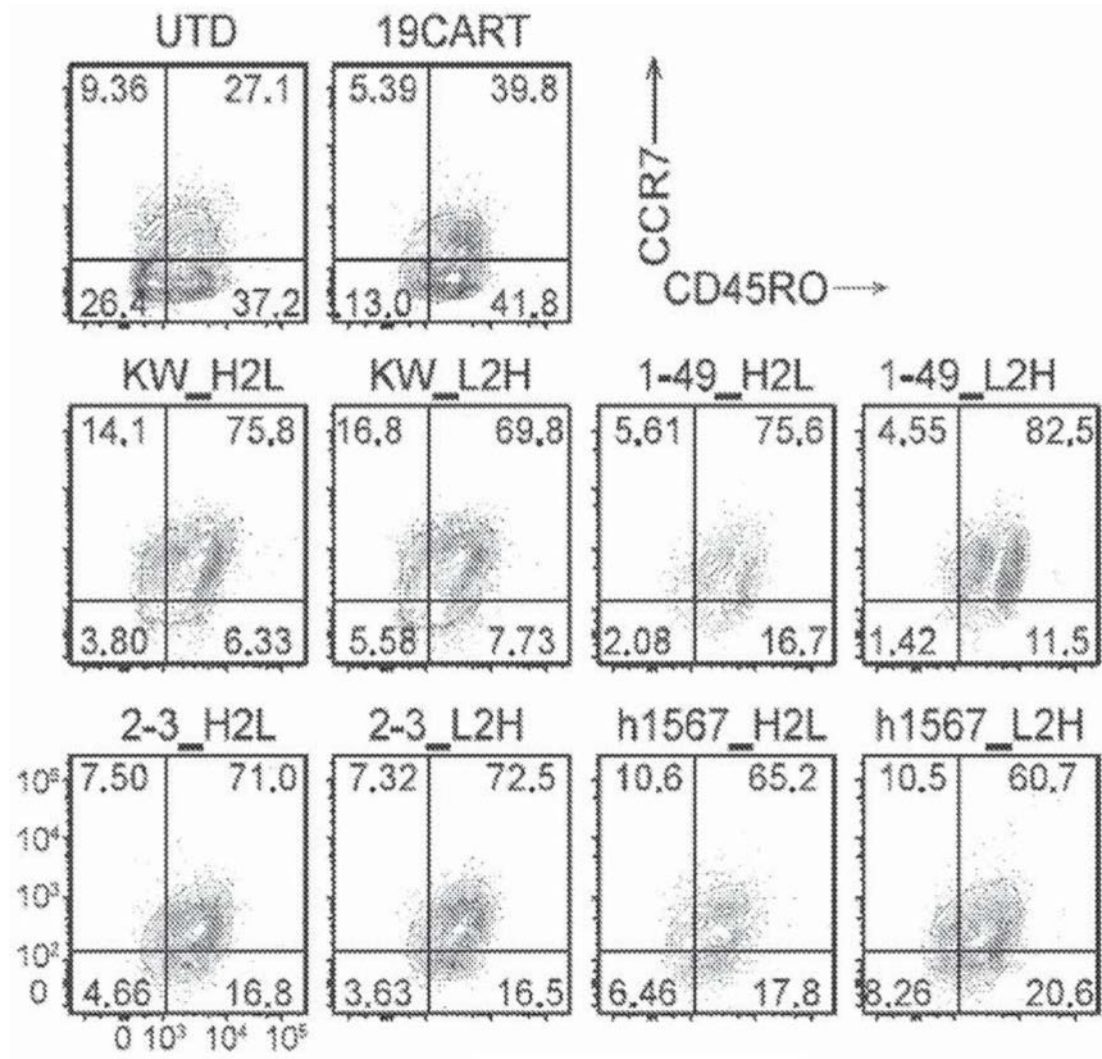


图8

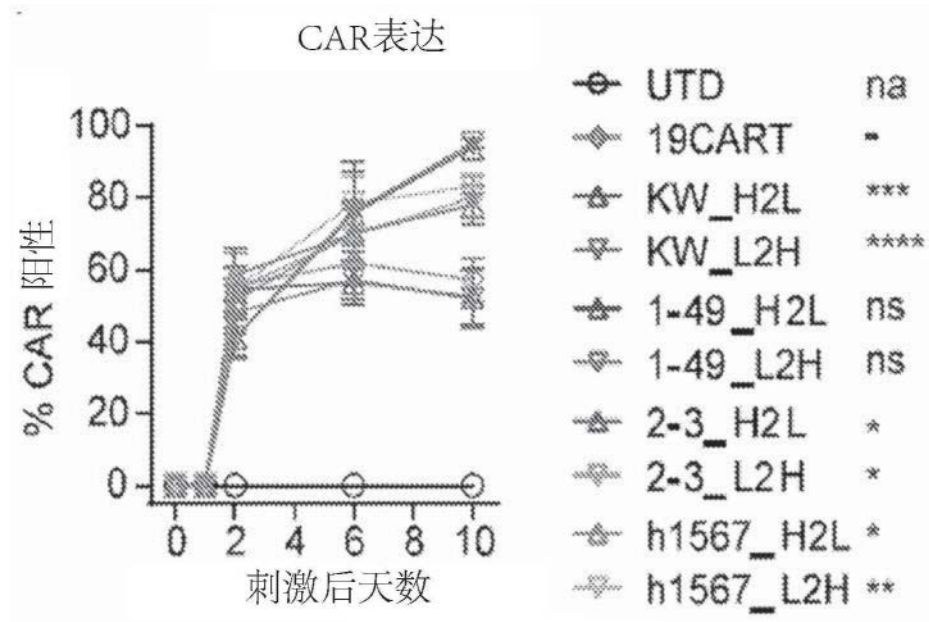


图9

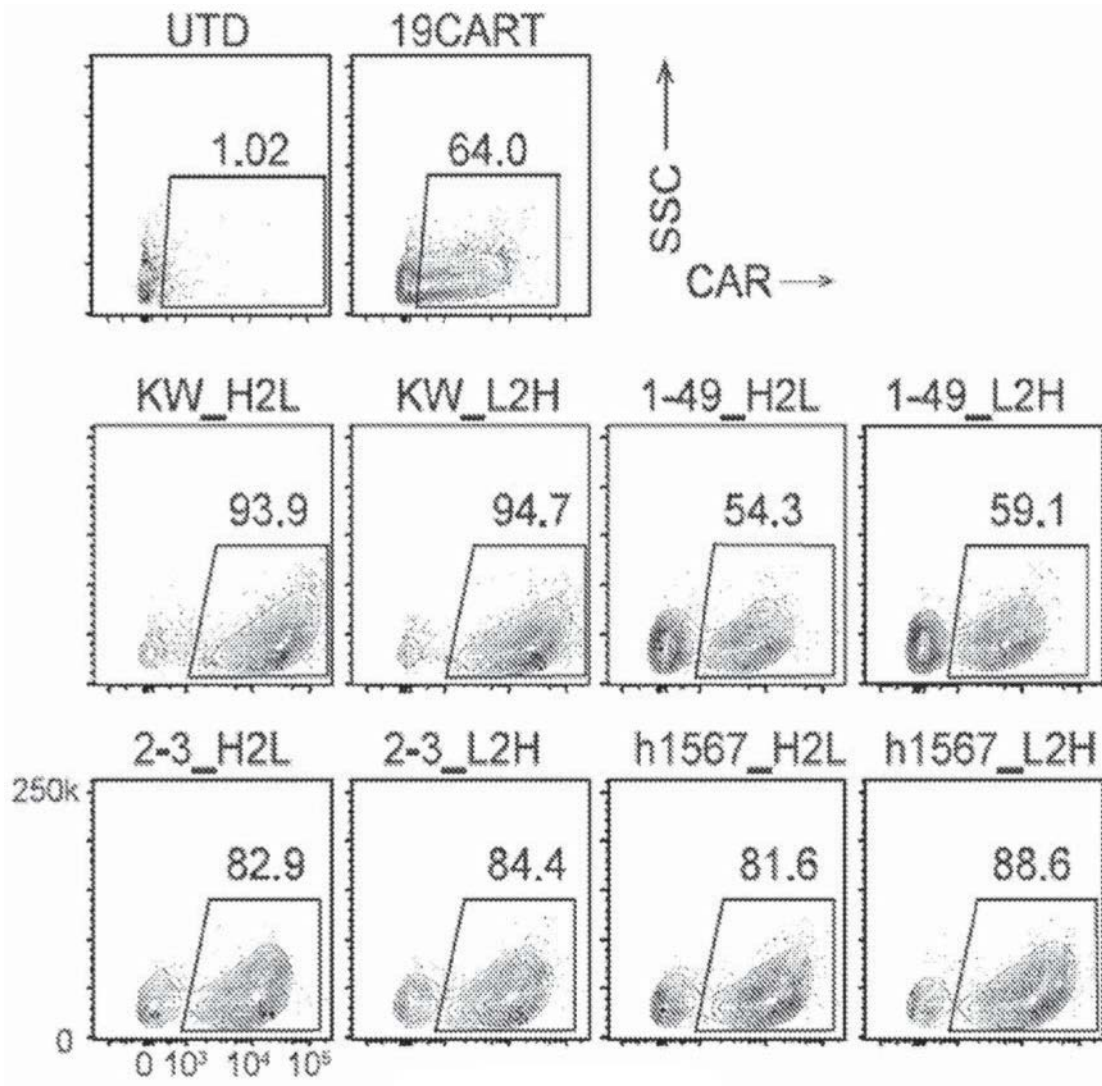


图10

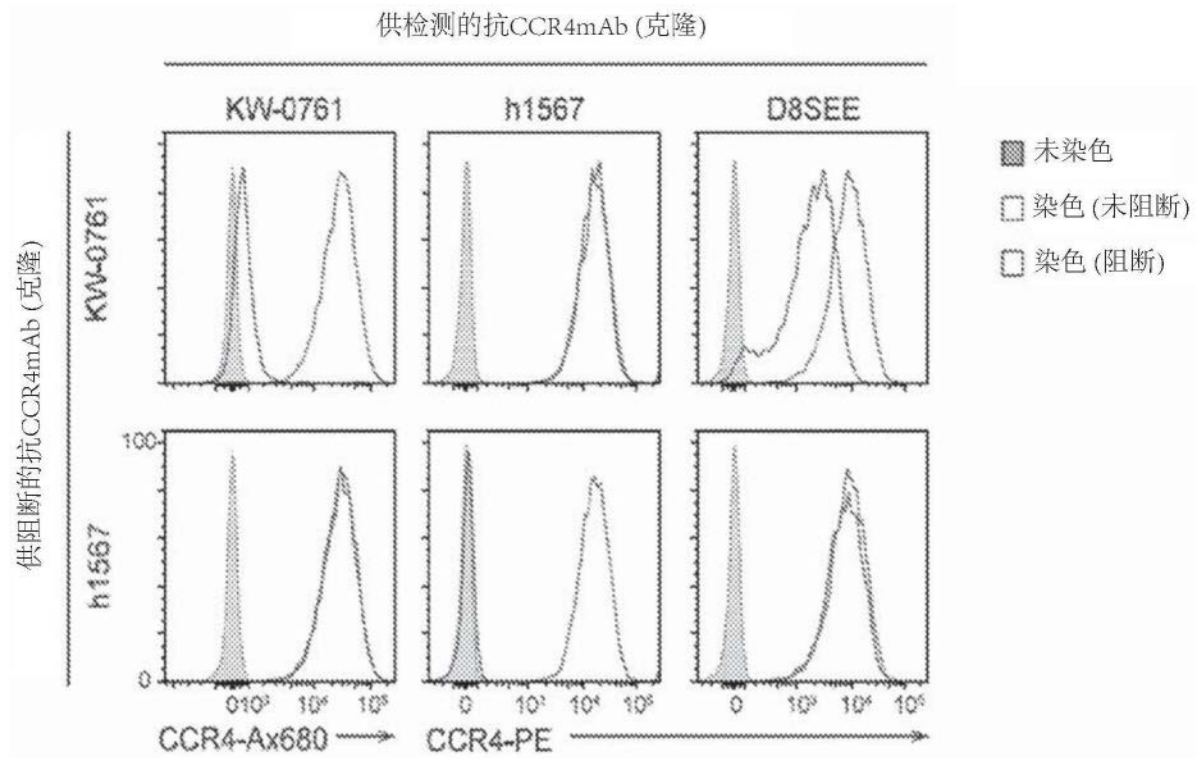


图11

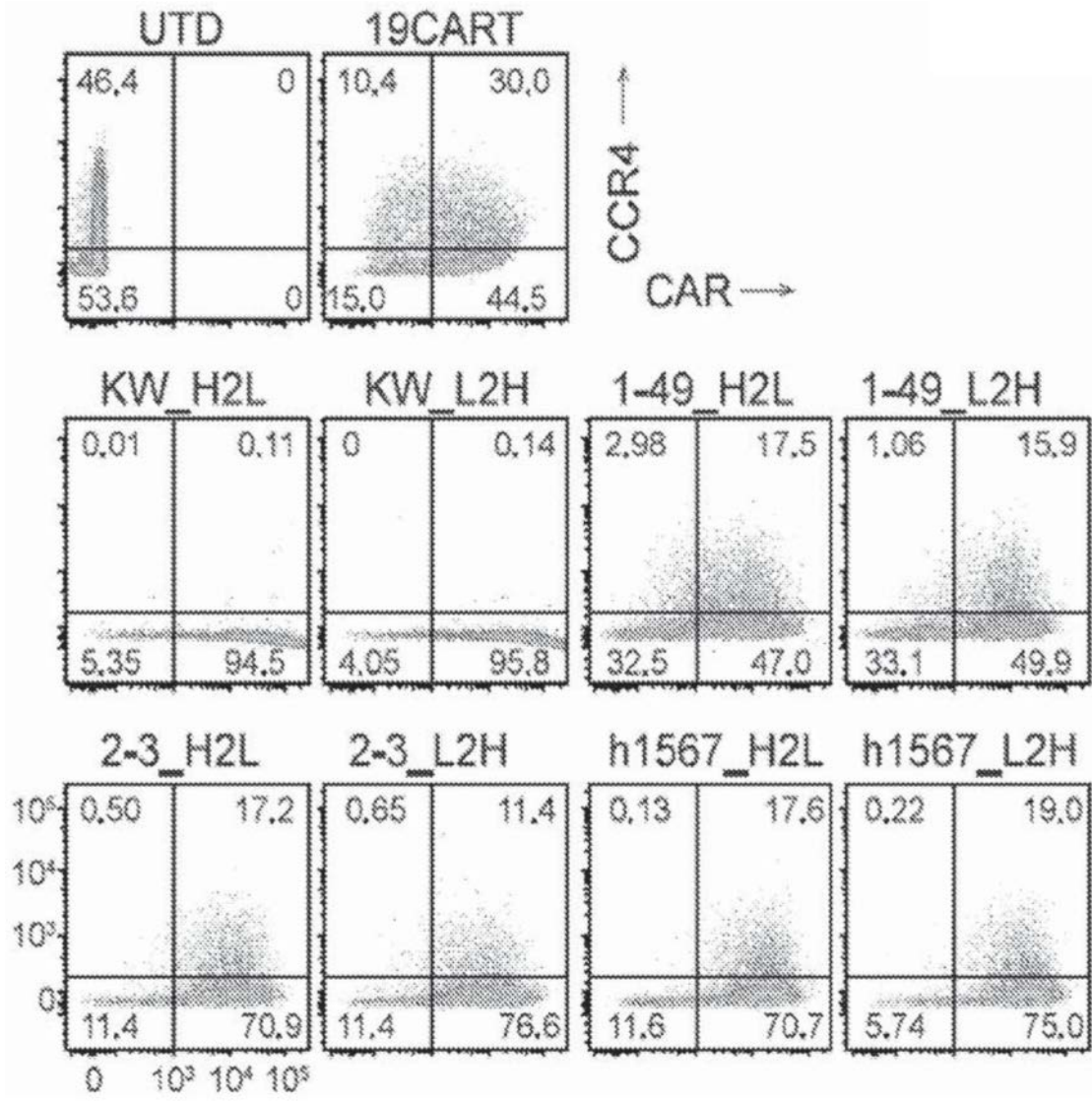


图12

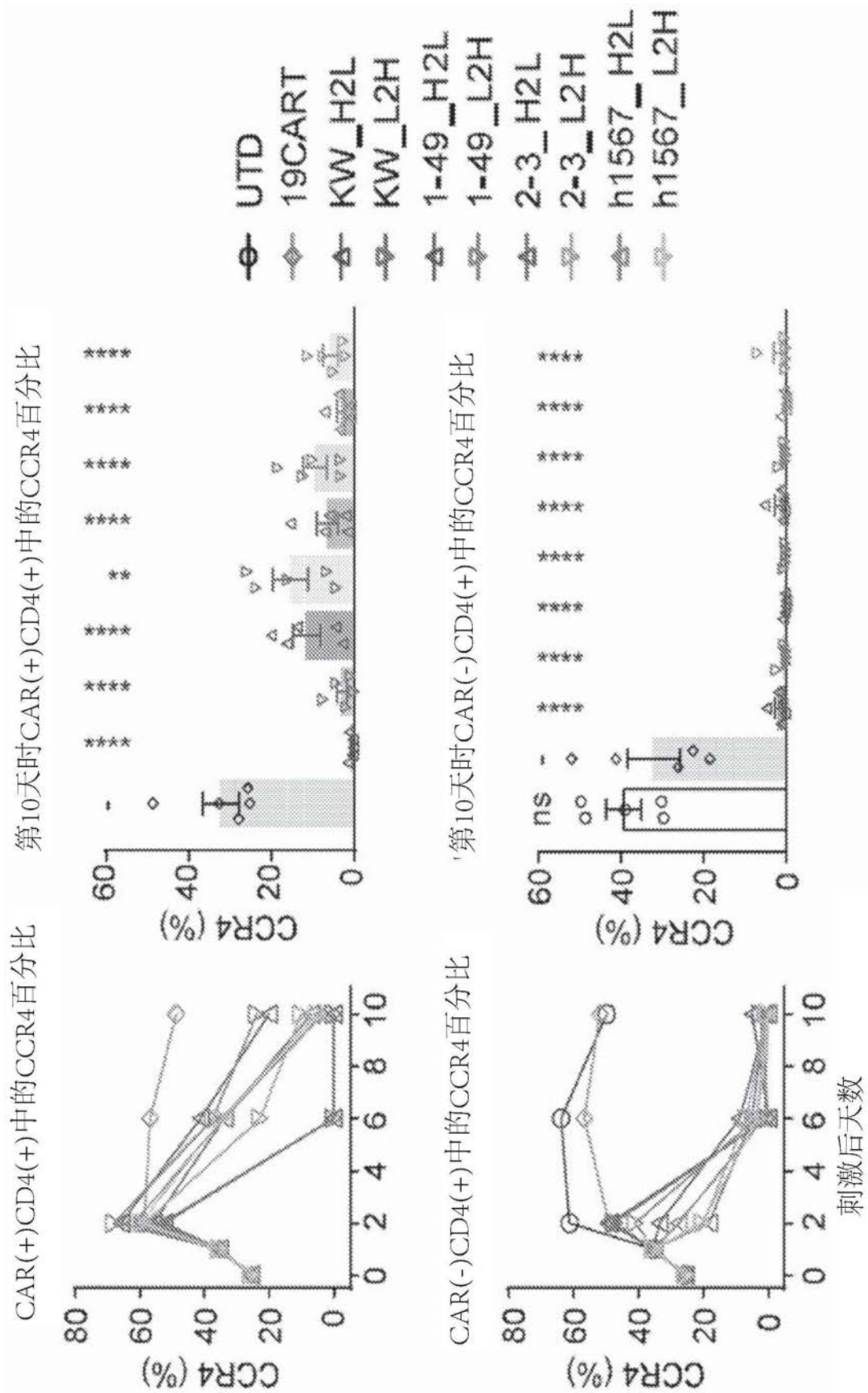


图13

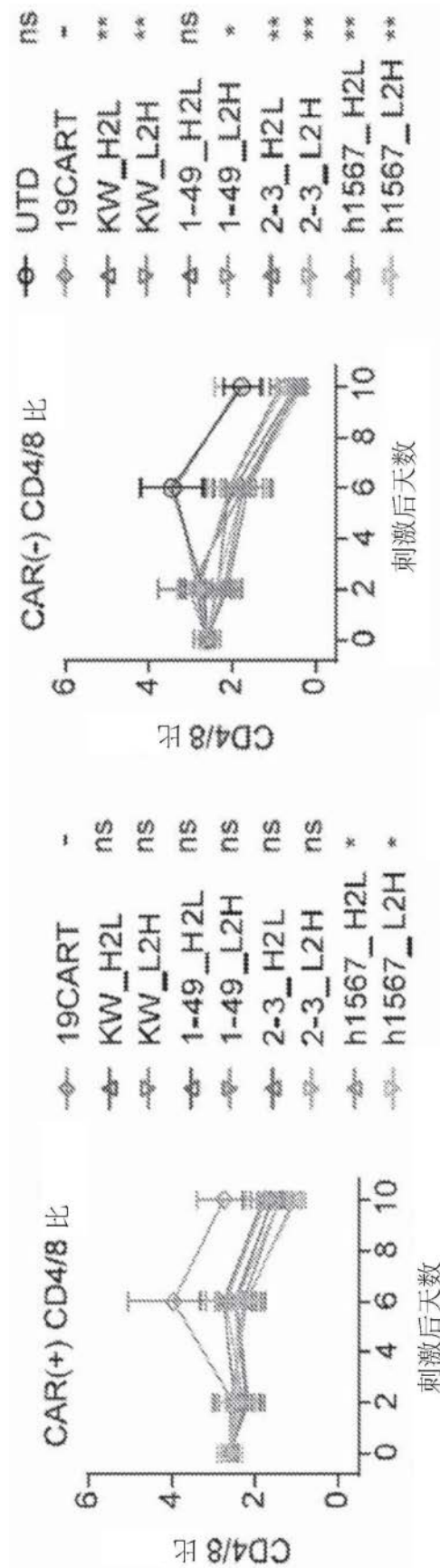


图14

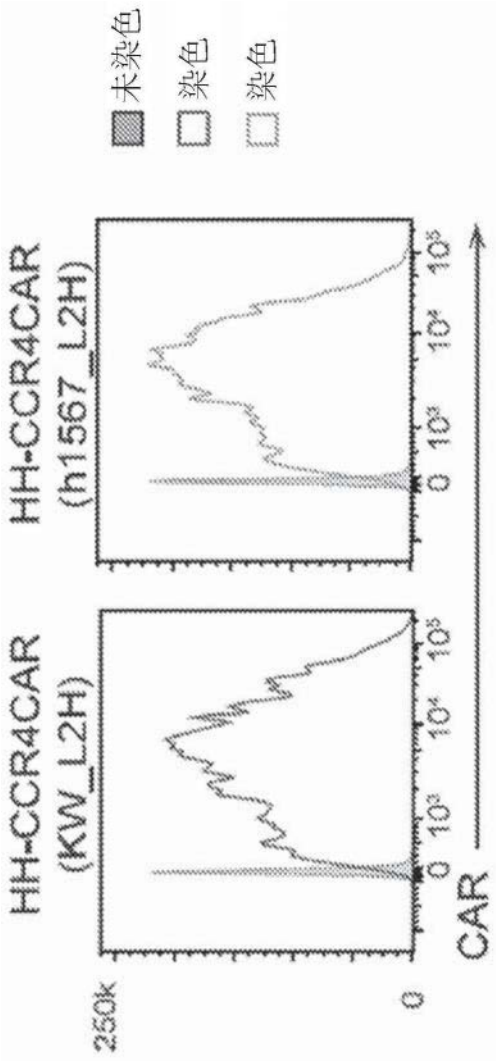


图15

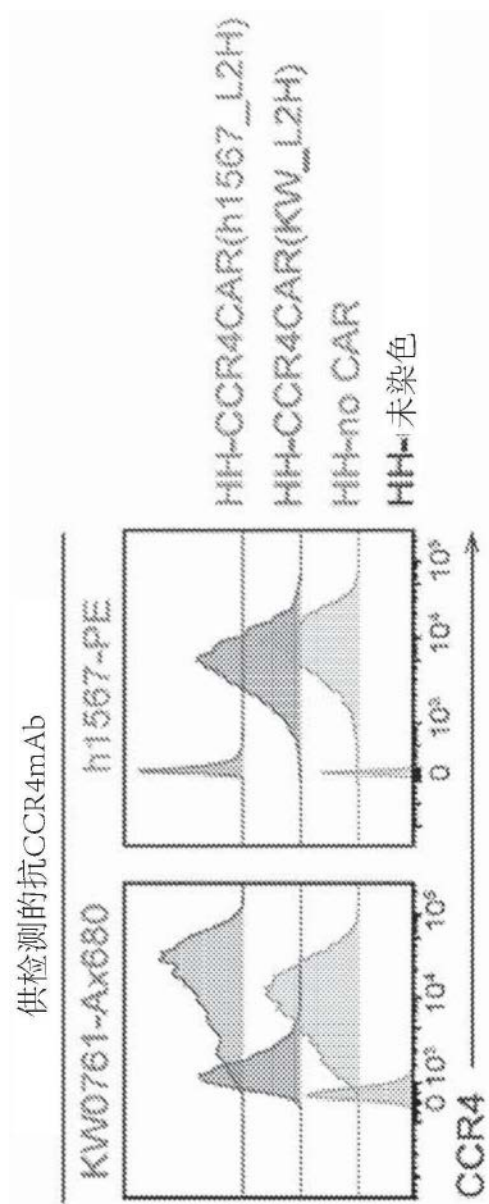


图16

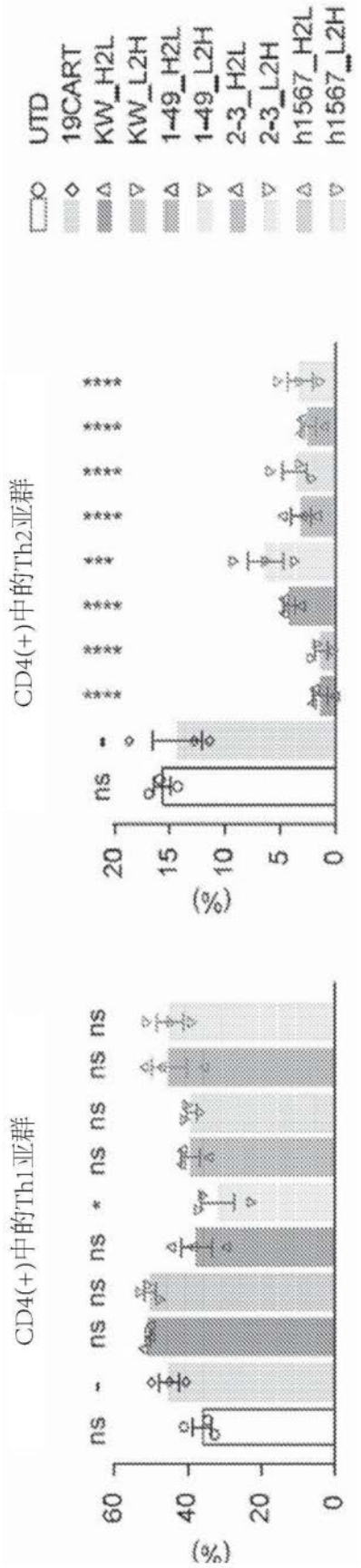


图17

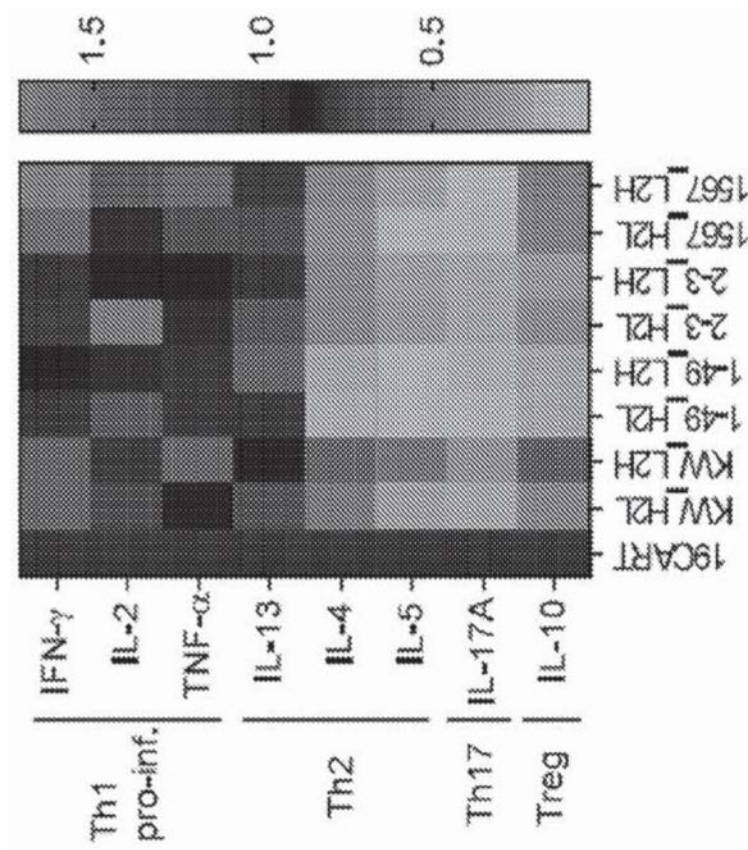


图18

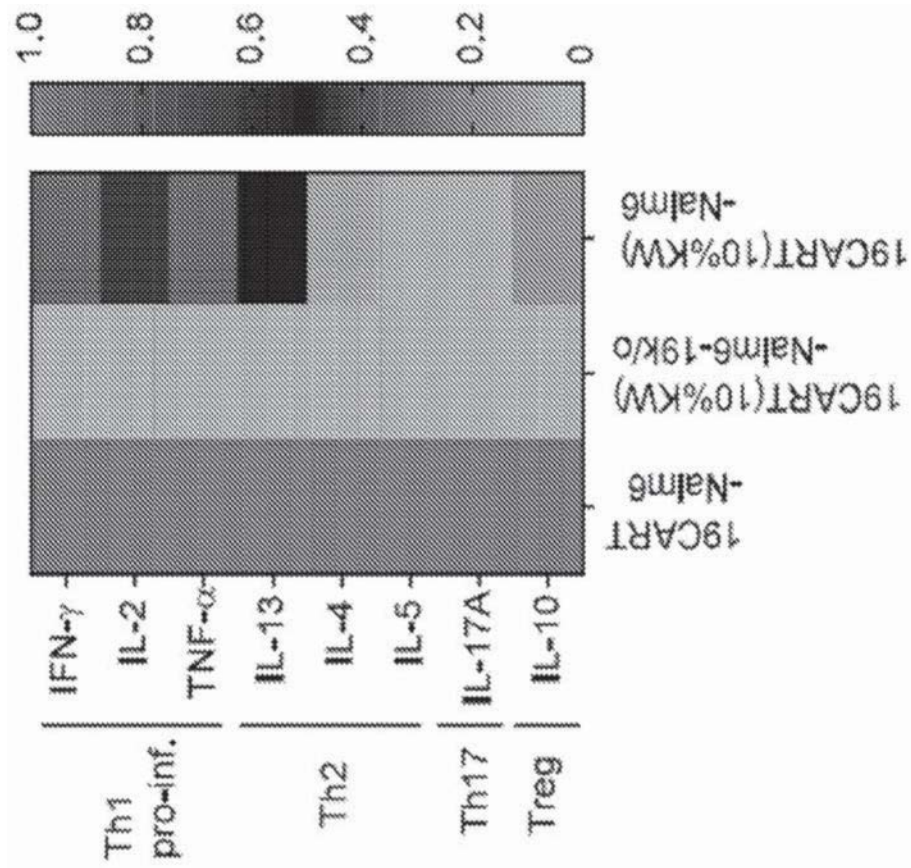


图19

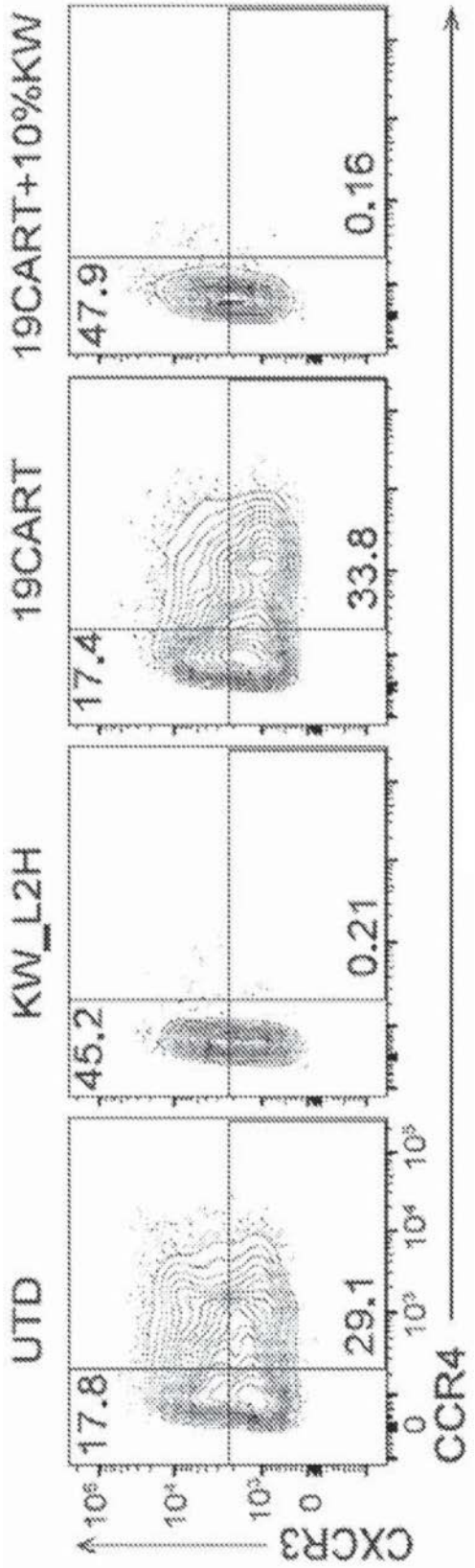


图20

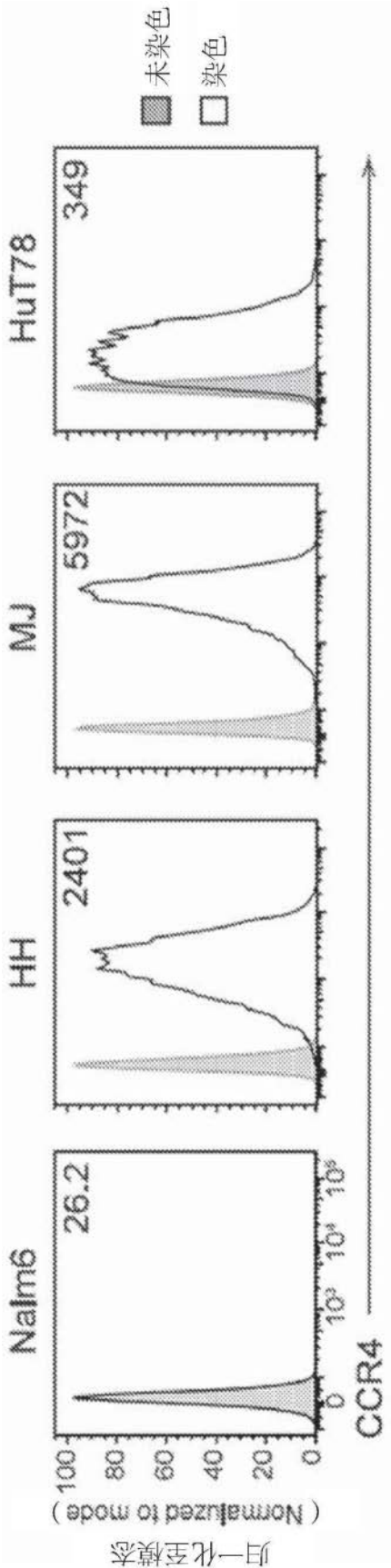


图21

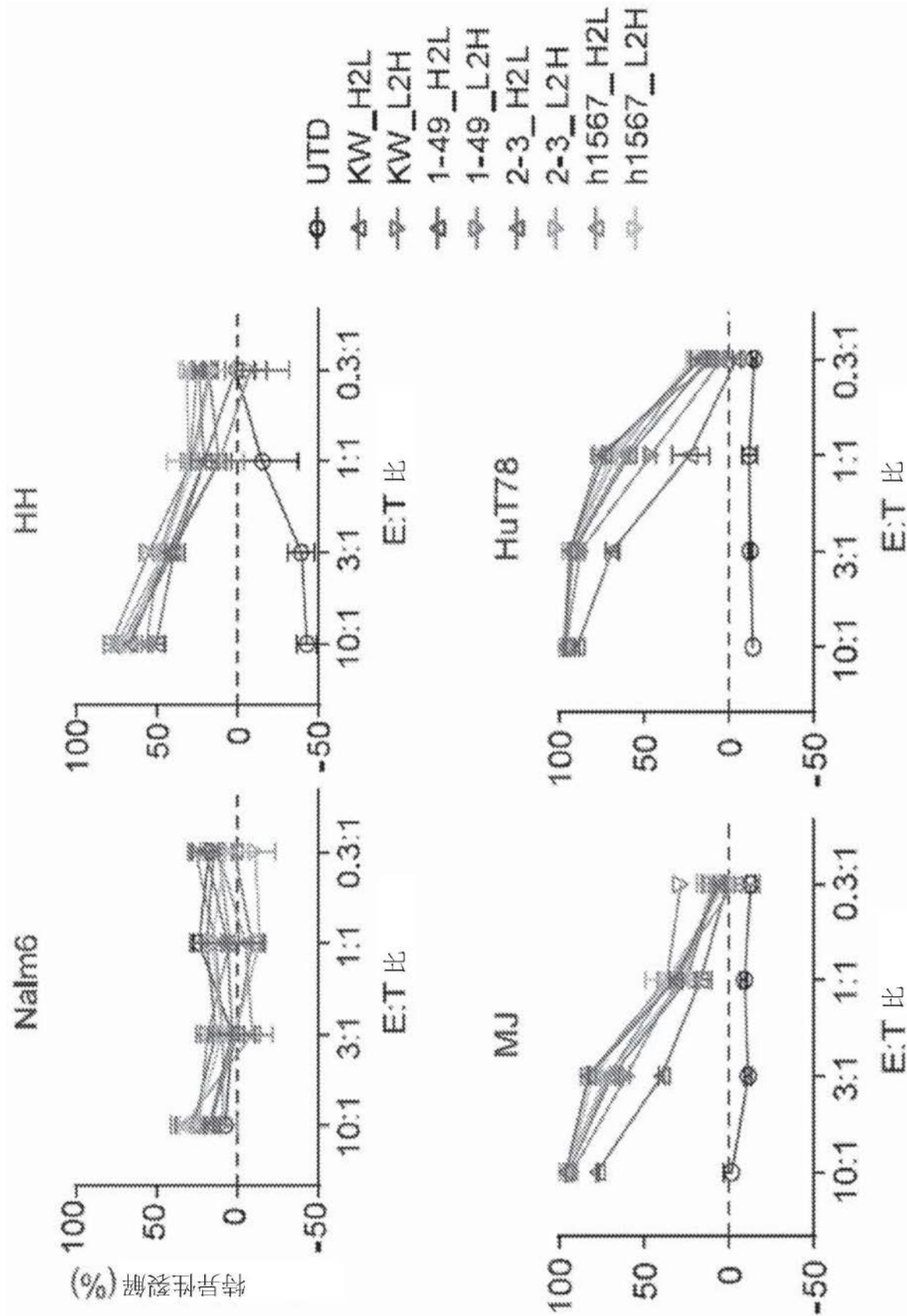


图22

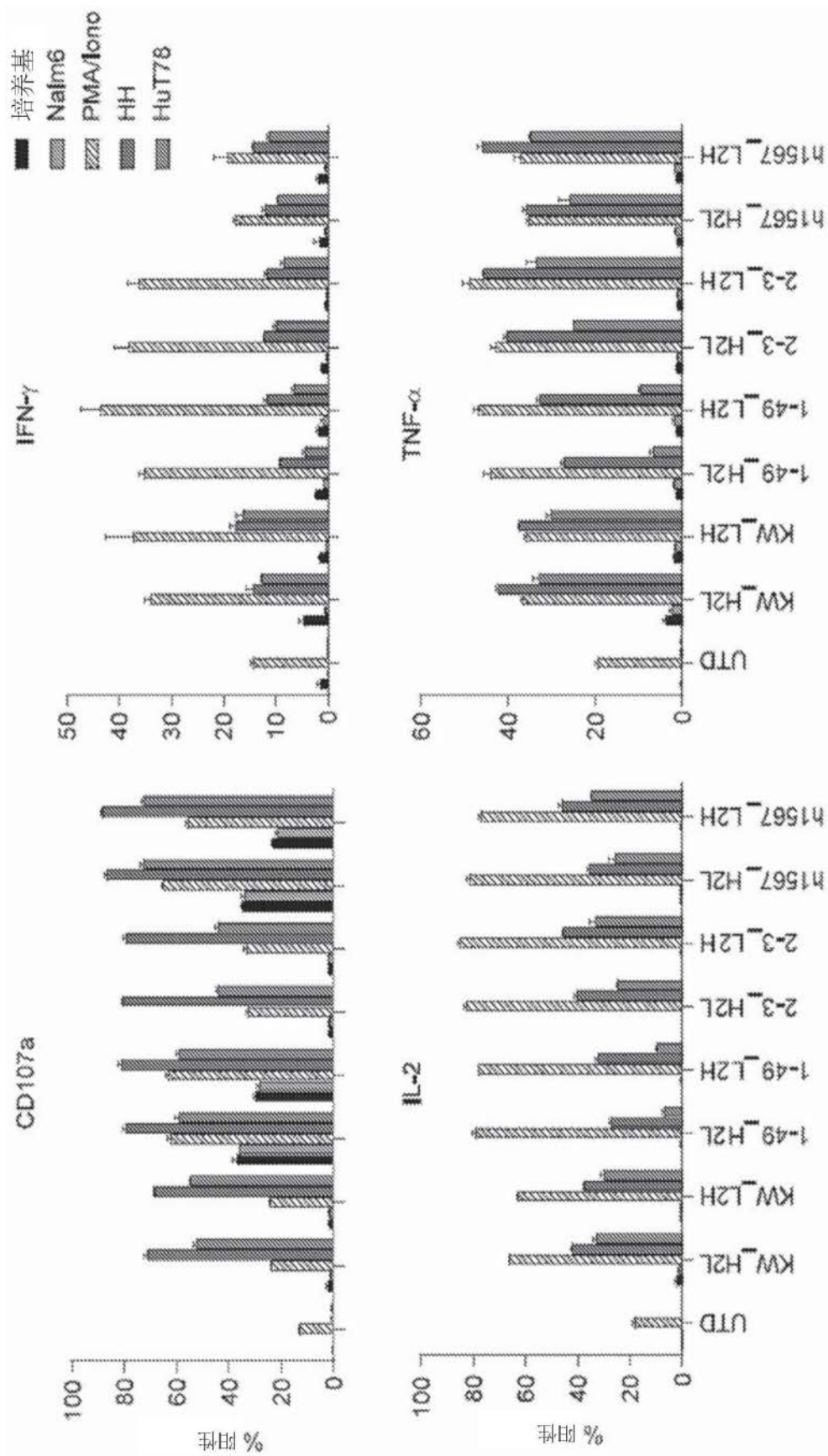


图23

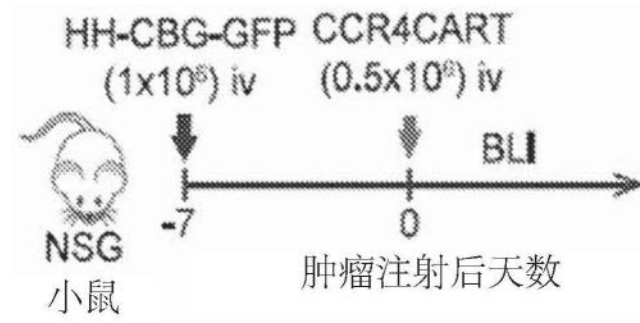


图24

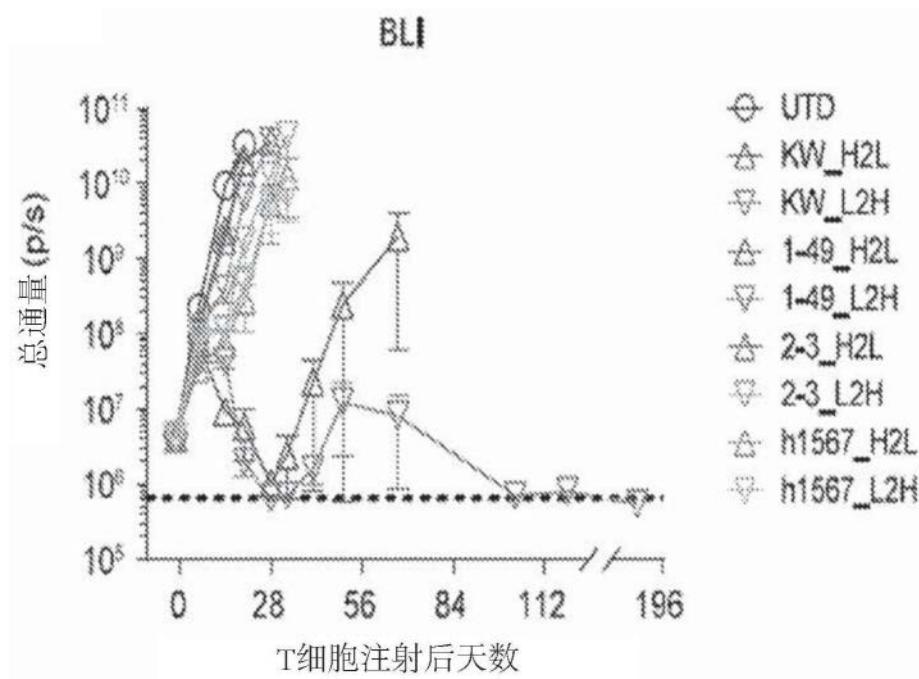


图25

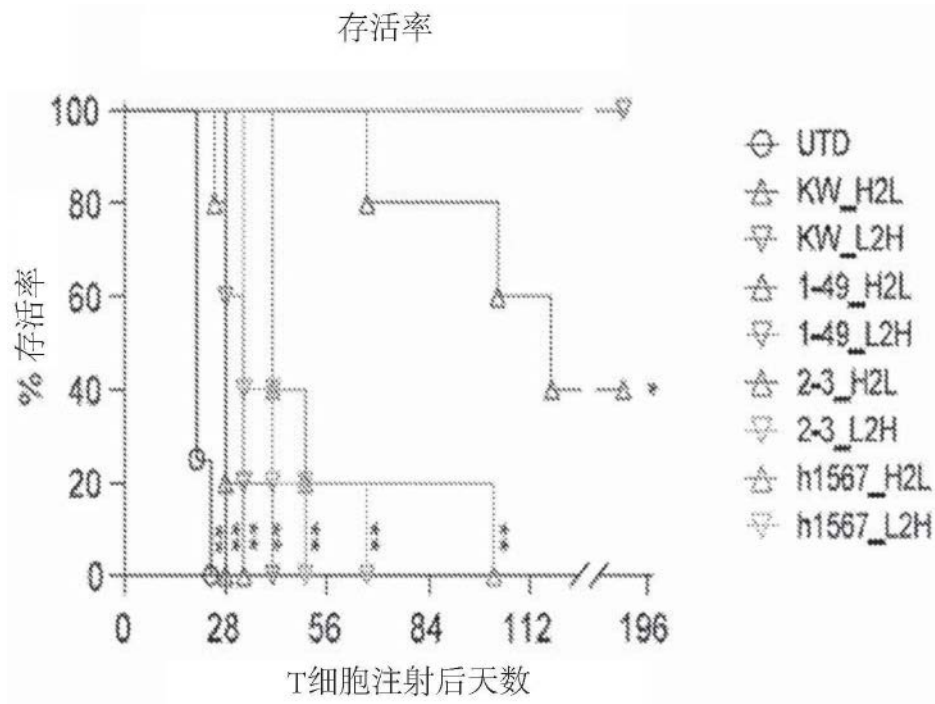


图26

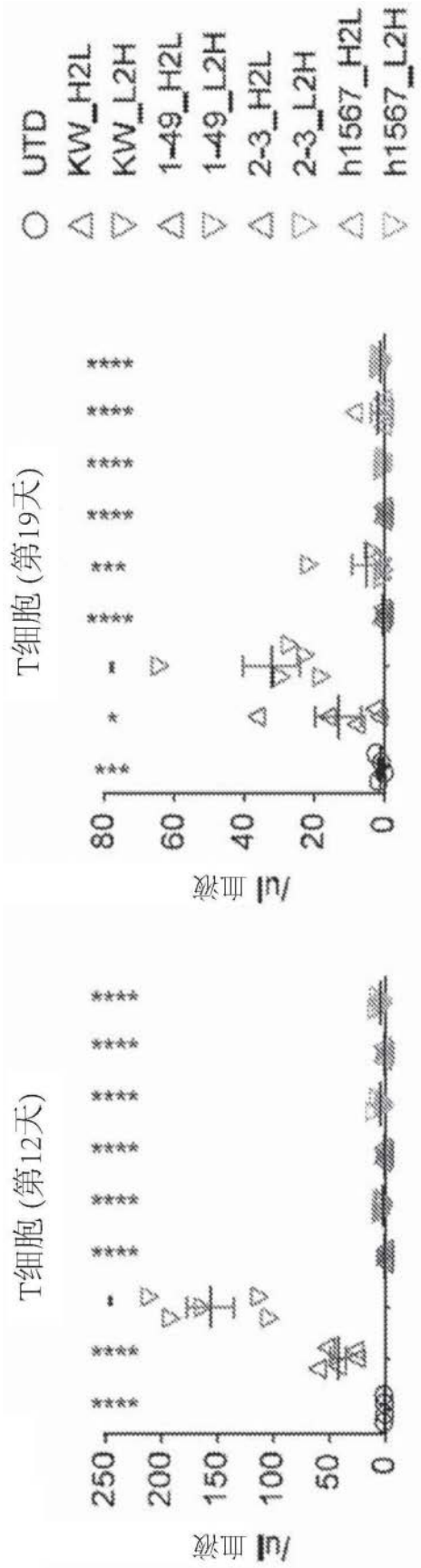


图27

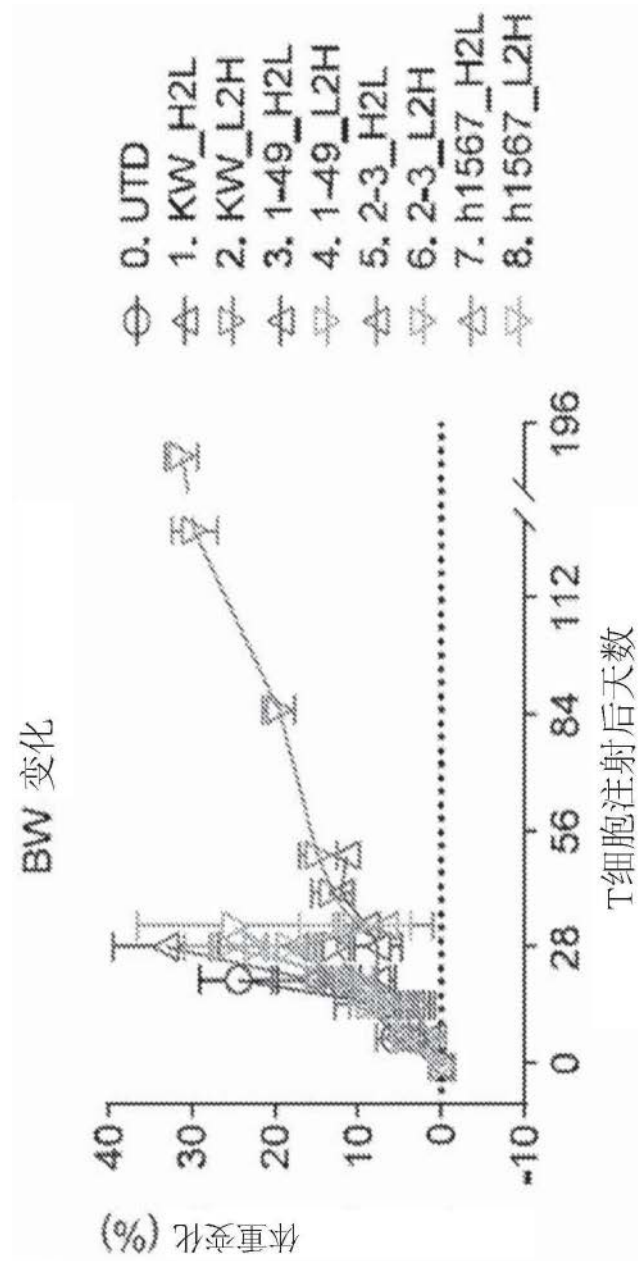


图28

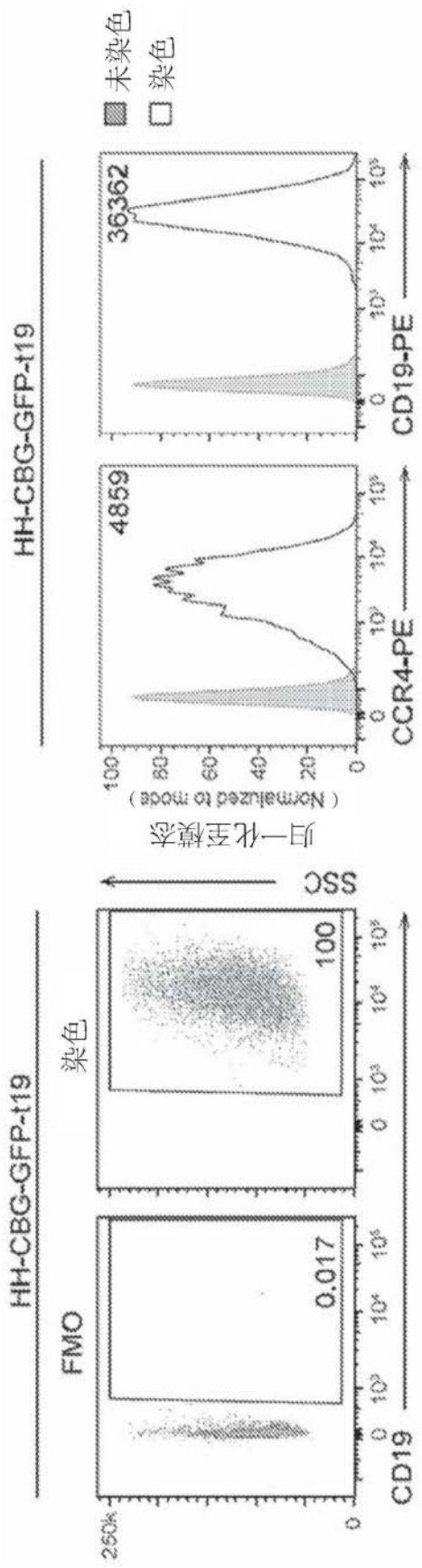


图29

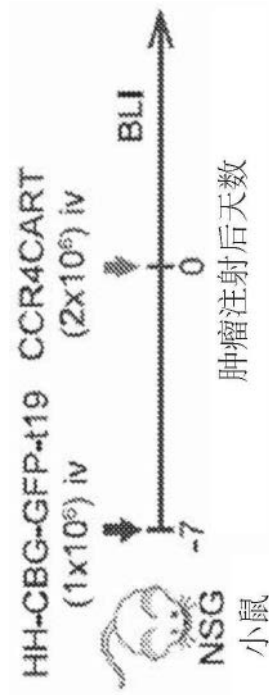


图30

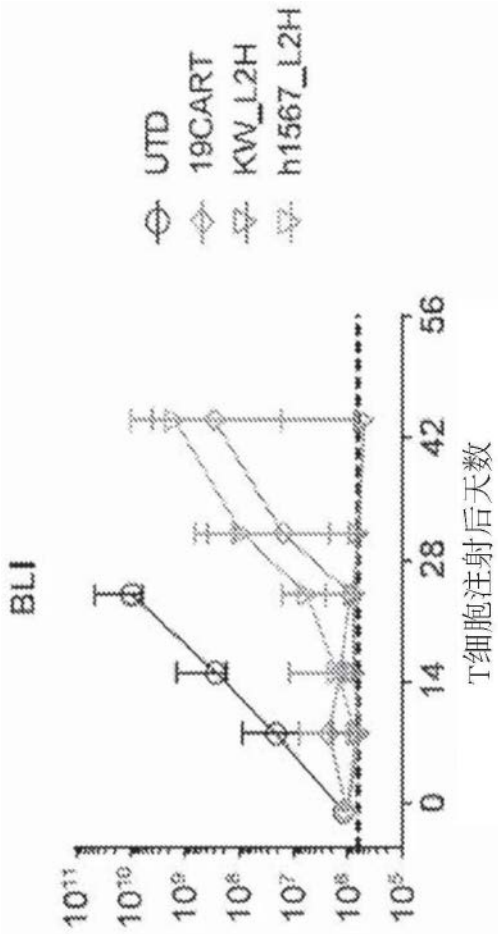


图31

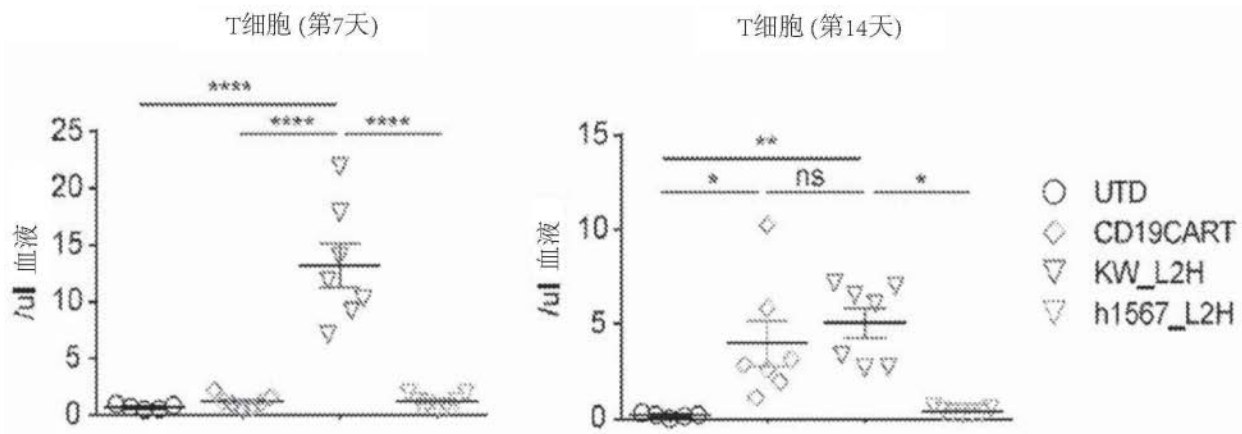


图32

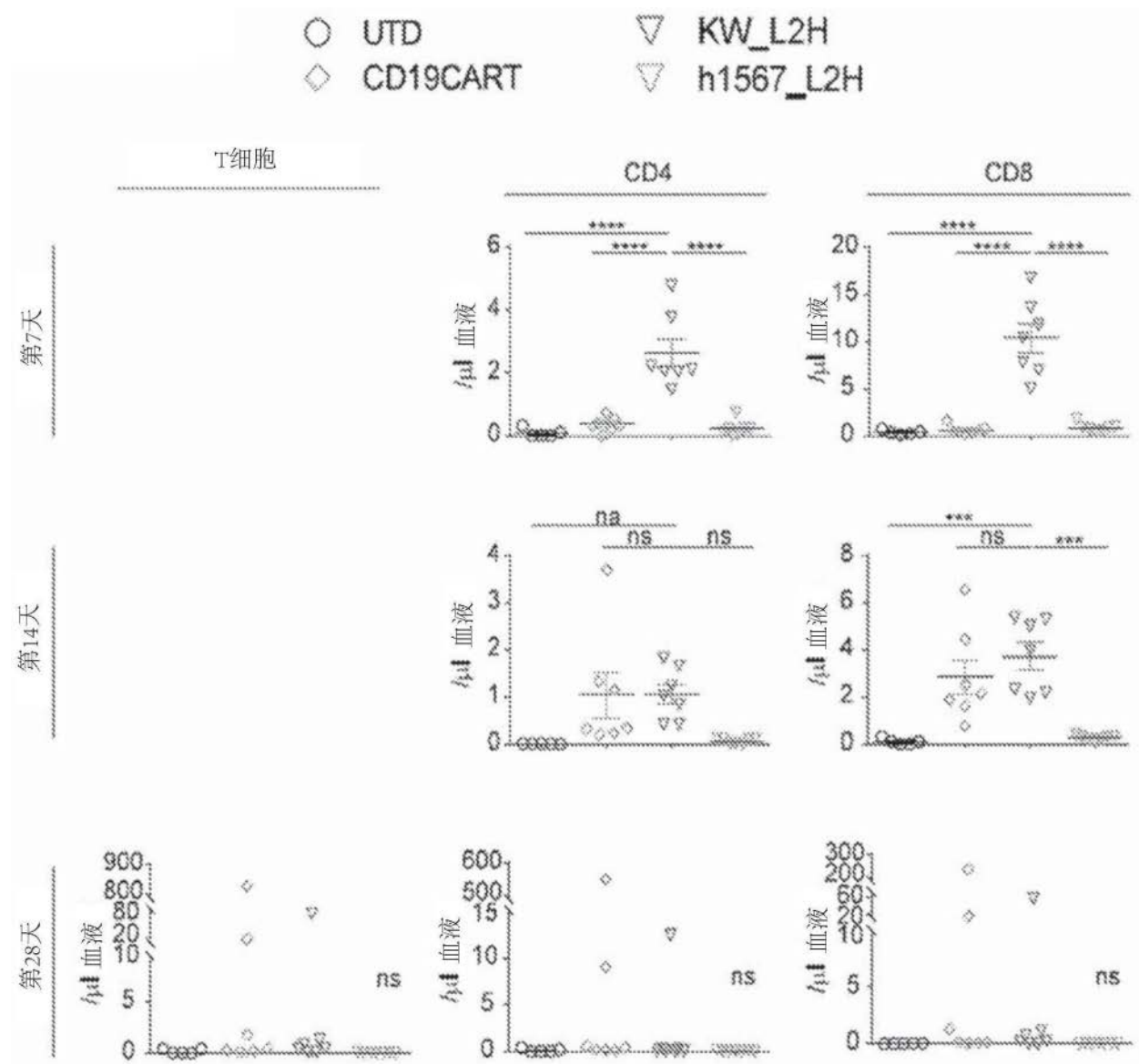


图33

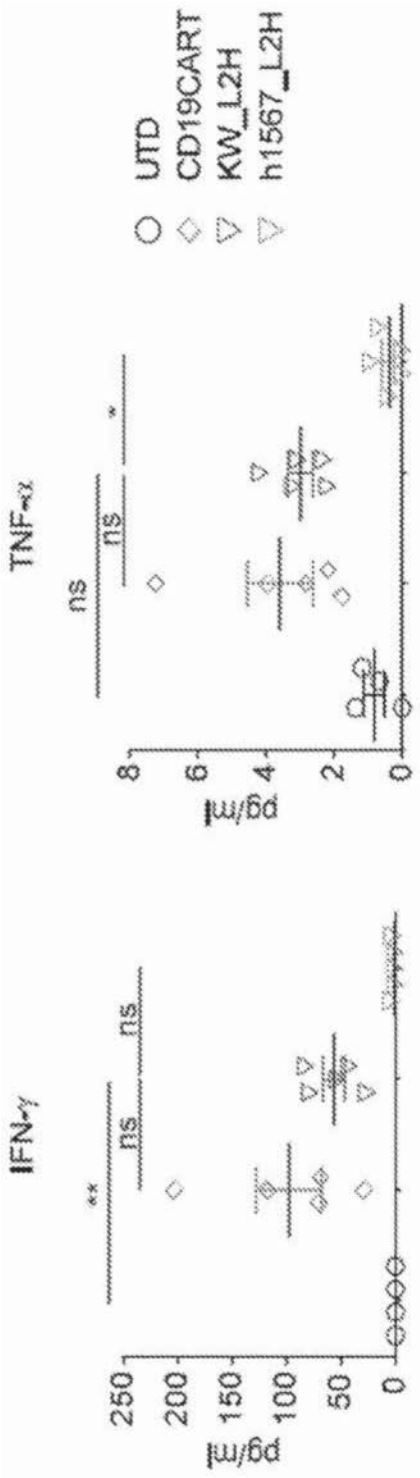


图34

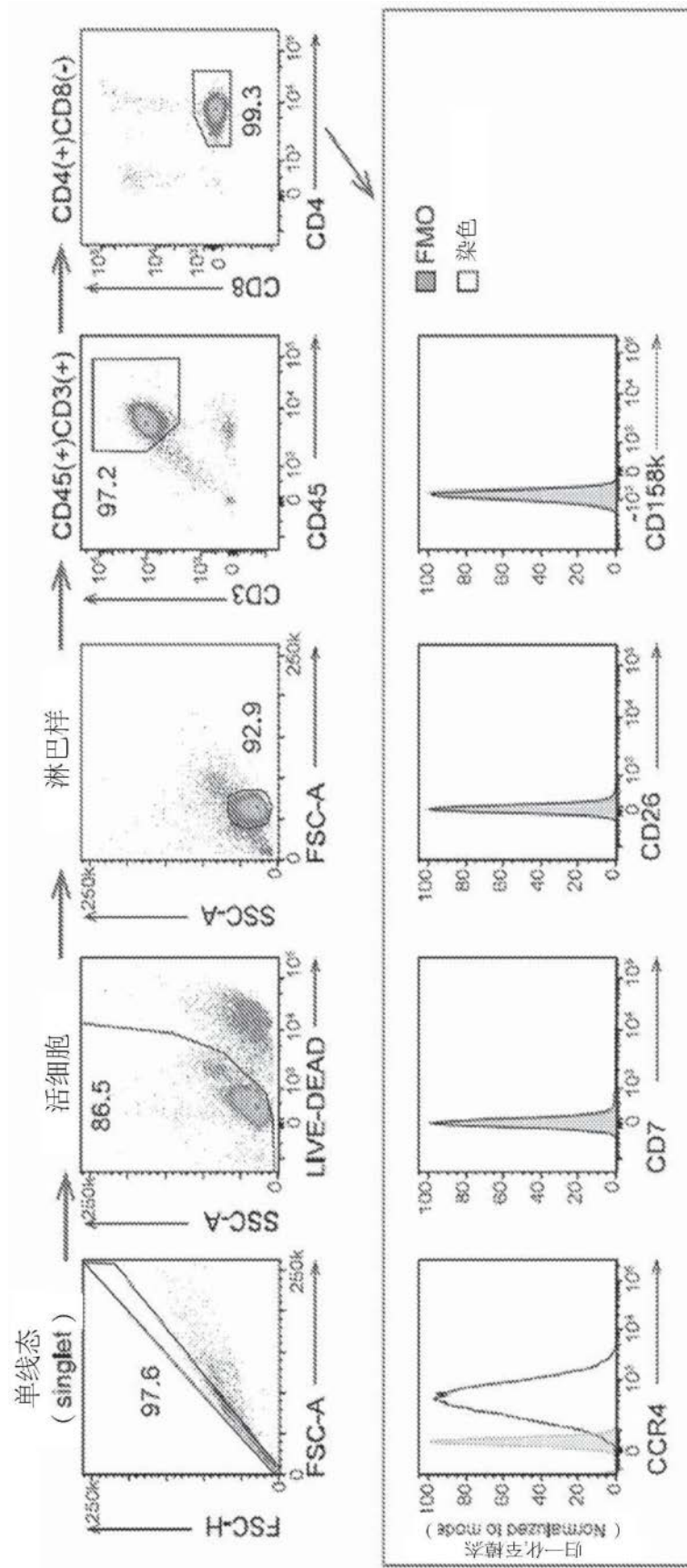


图35

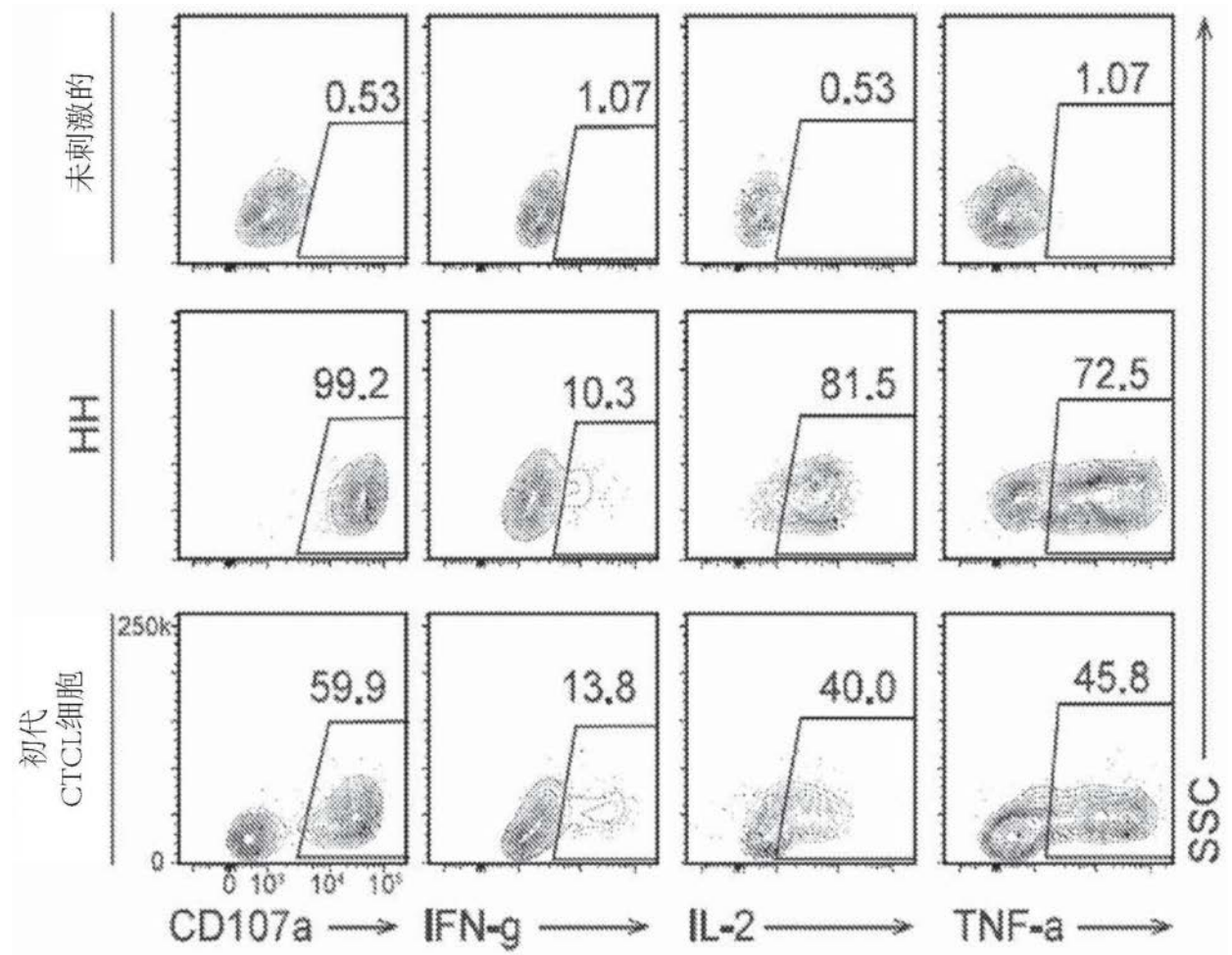


图36

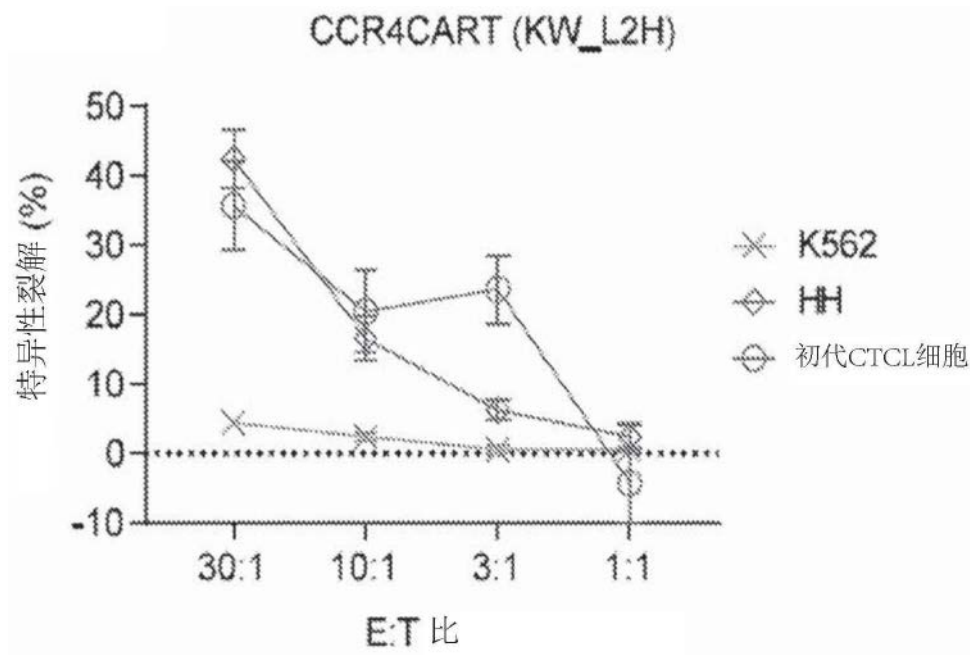


图37

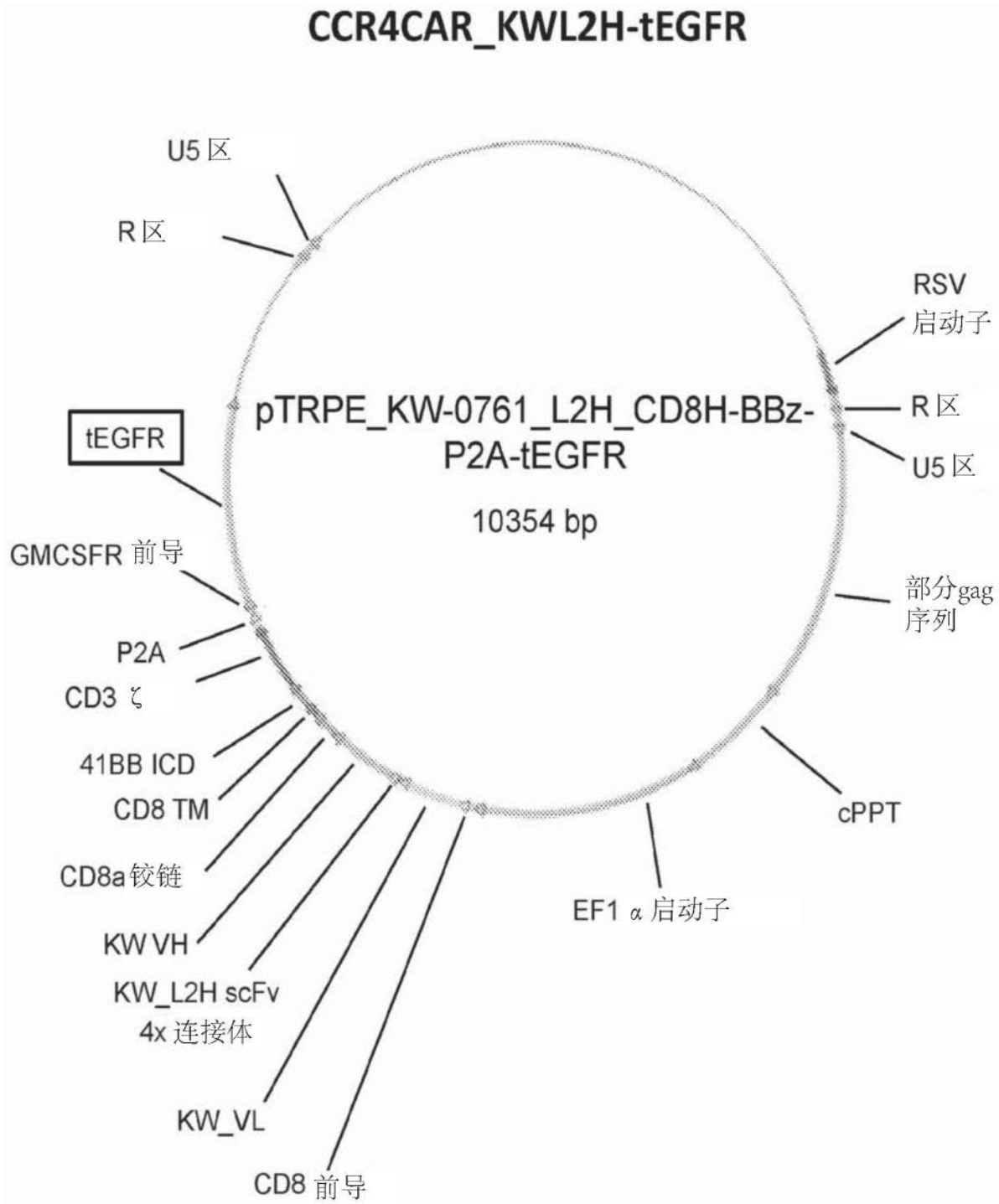


图38

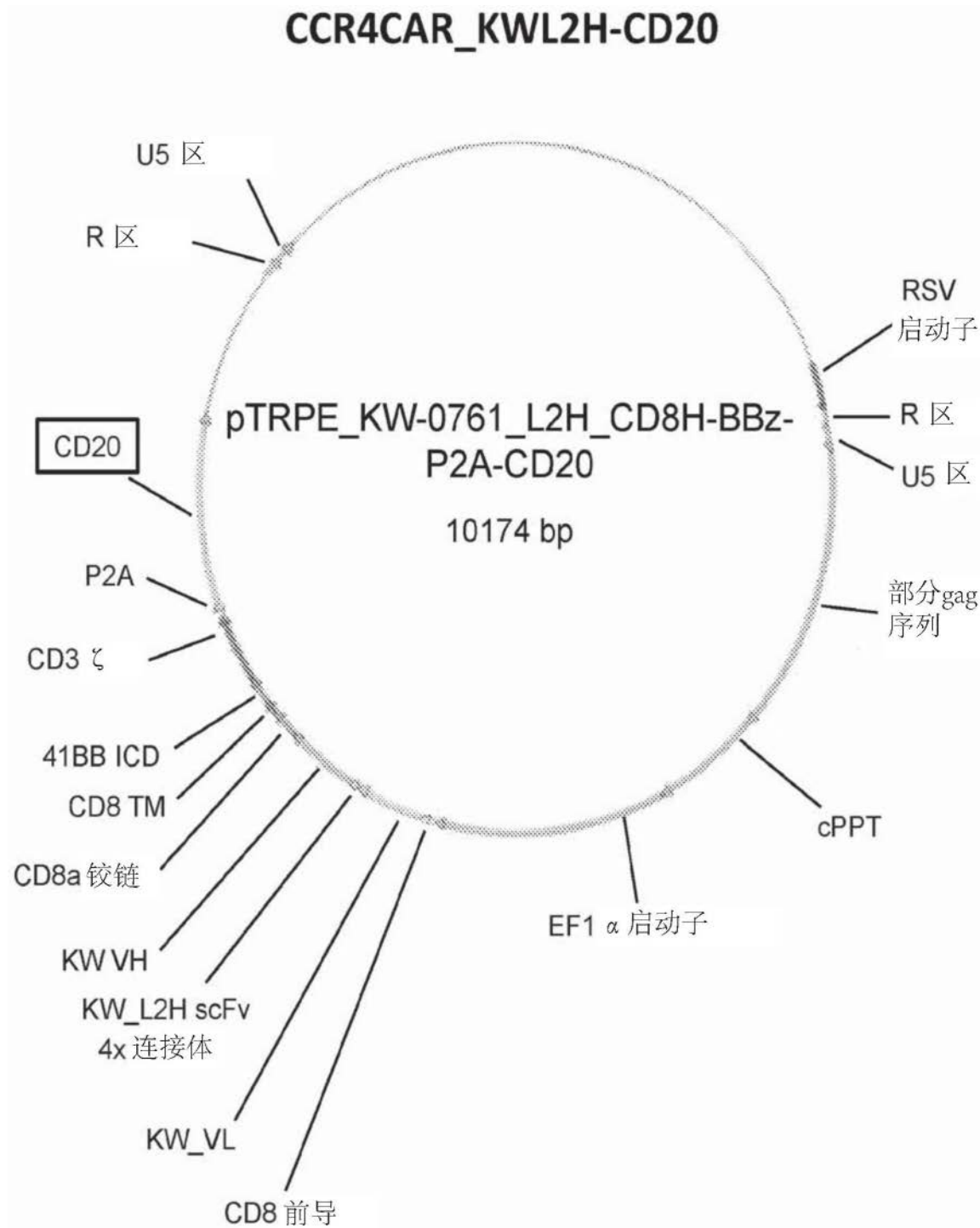


图39

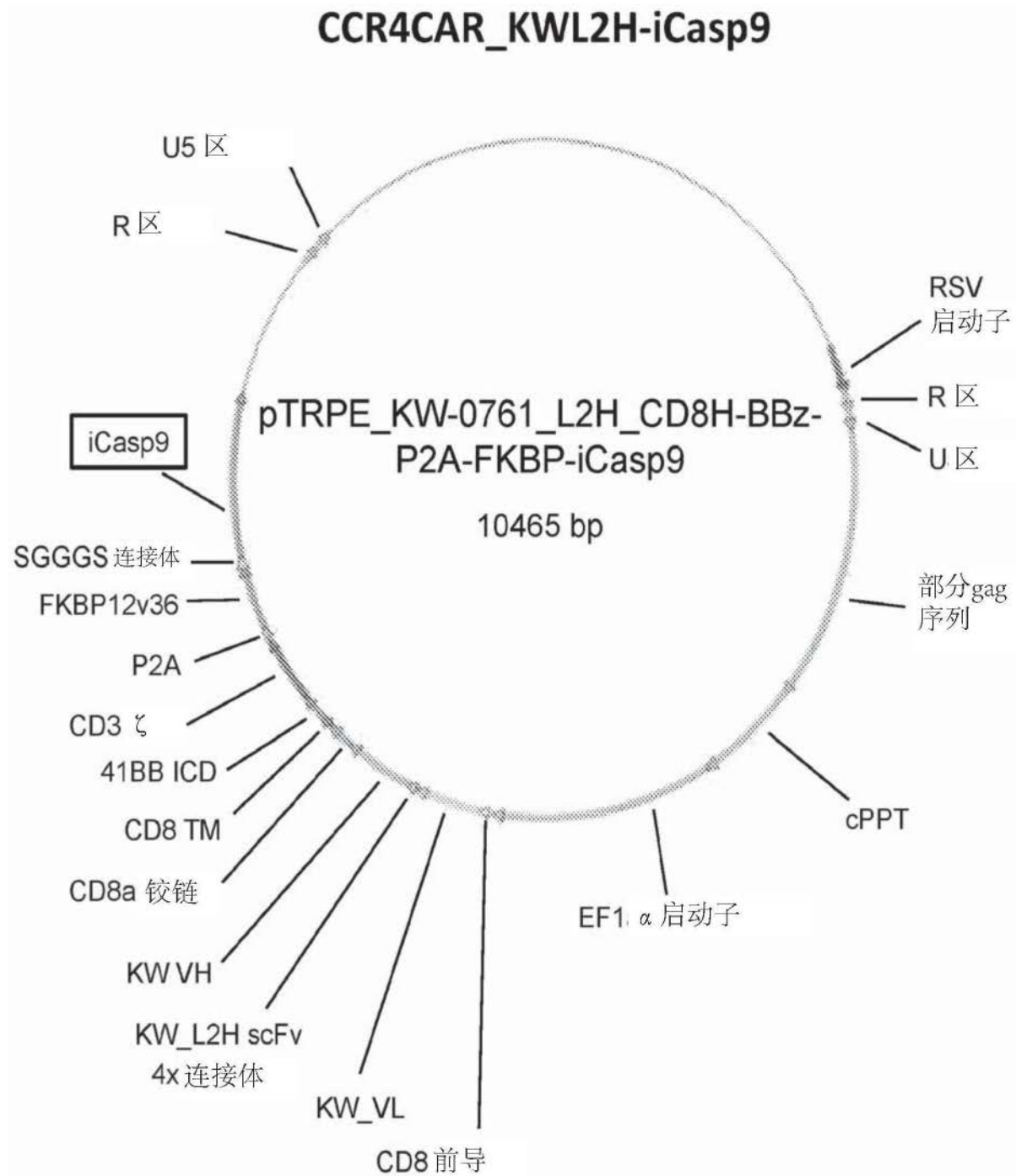


图40

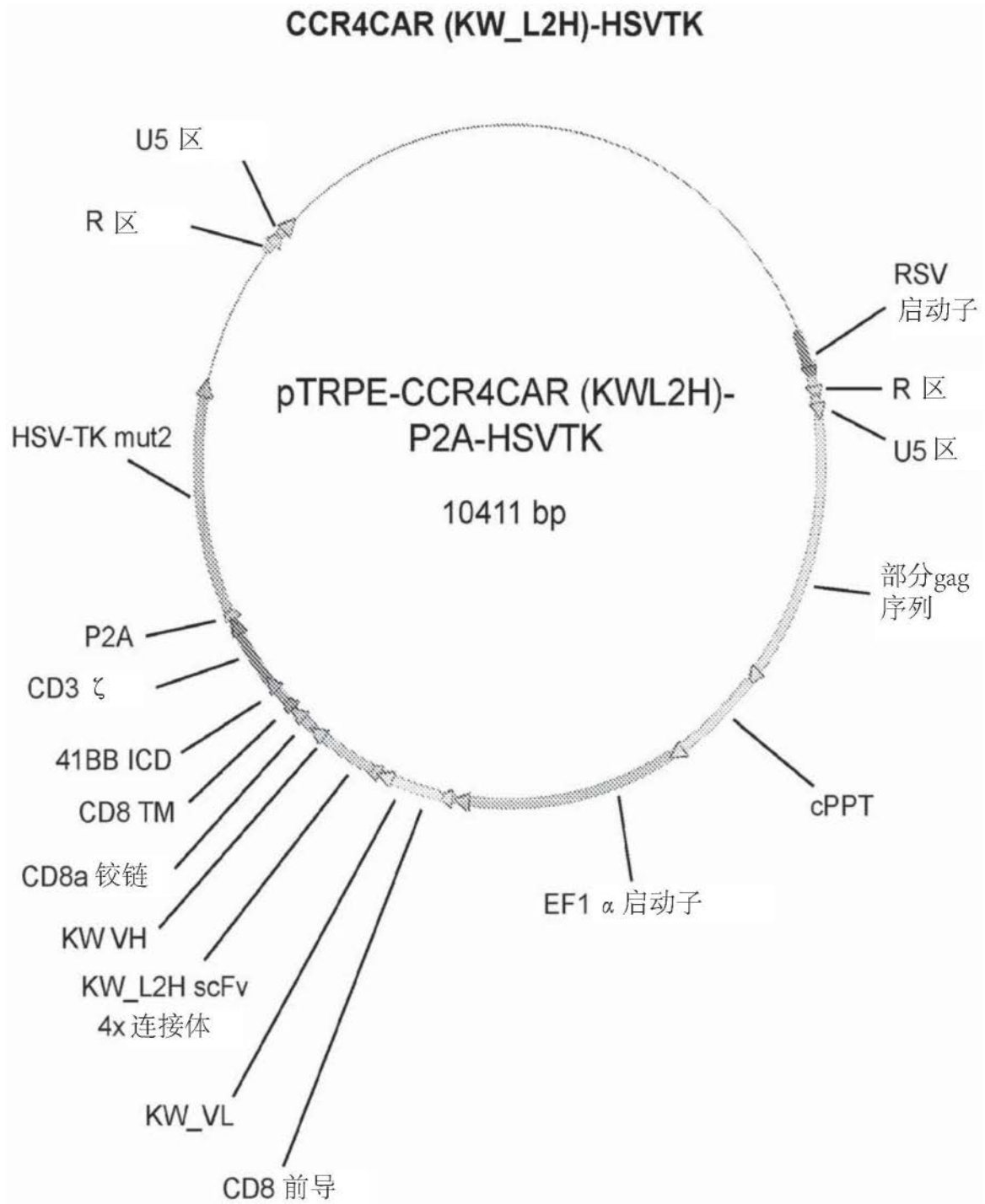


图41

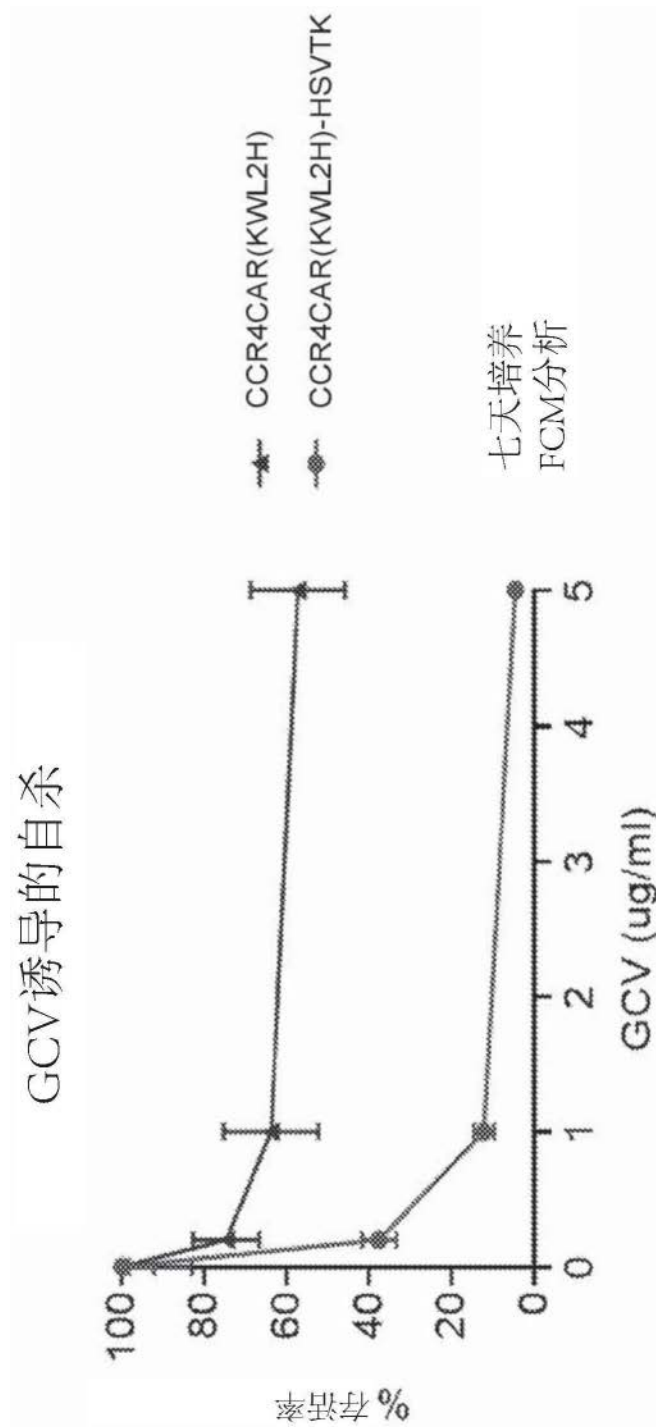


图42

CCR4CAR(KW_L2H)-HSVTK-dnTGFbRII (最高)

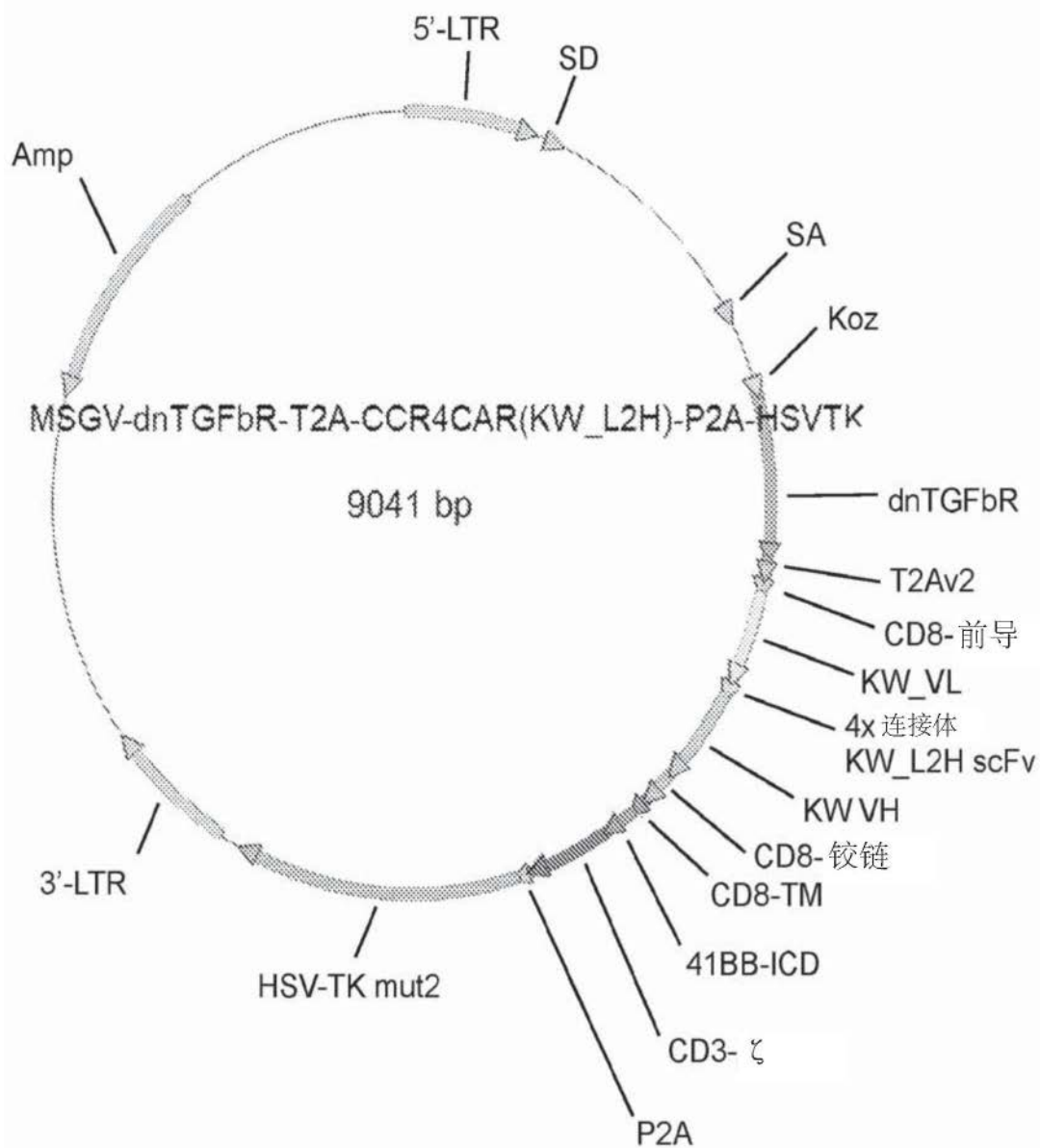


图43

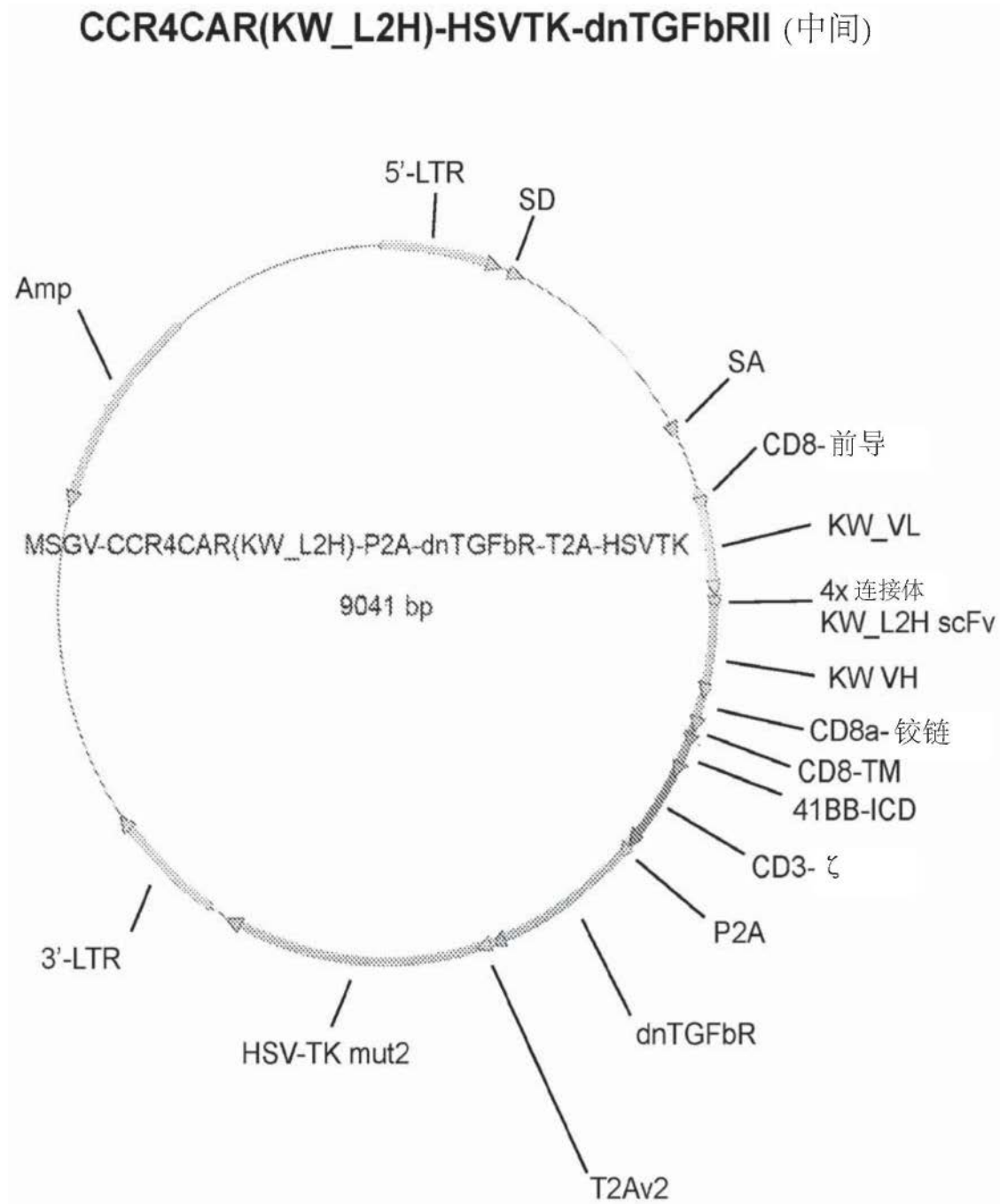


图44

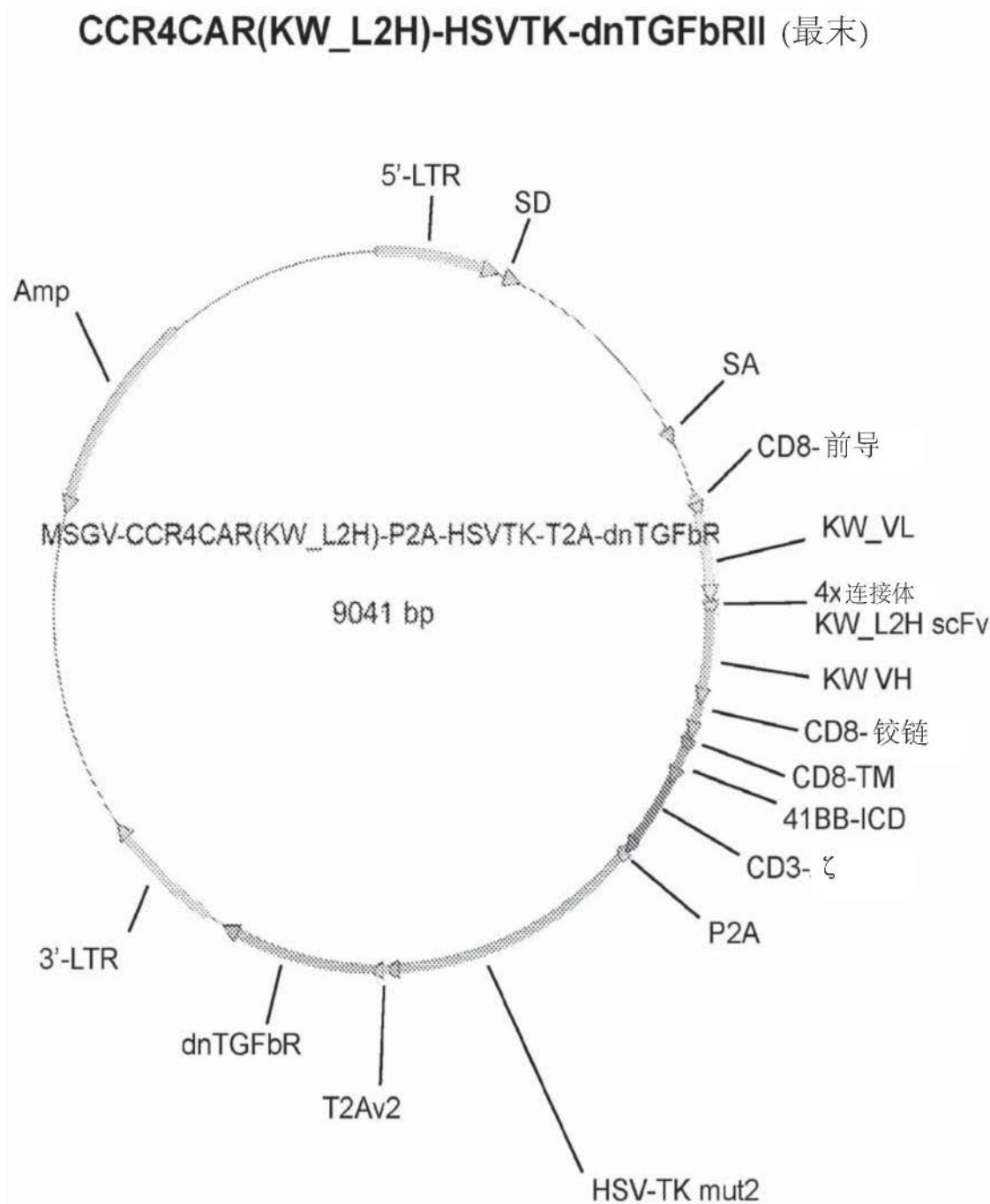


图45

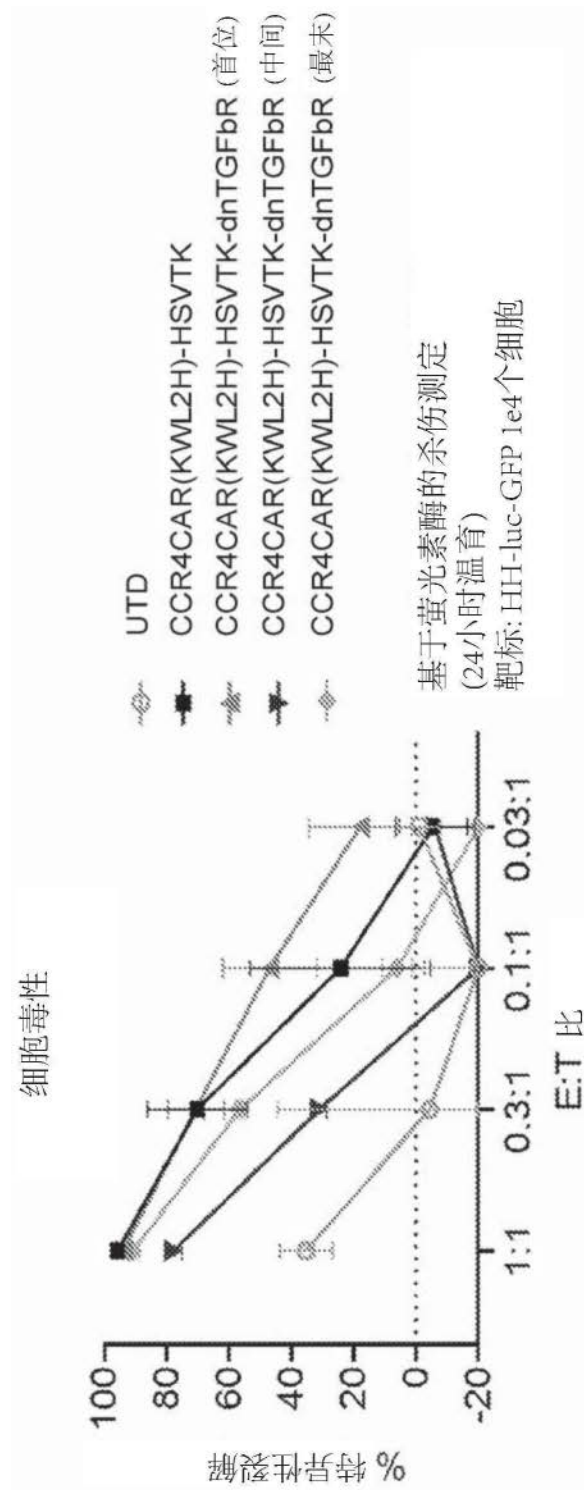


图46

sh-CCR4对T细胞系的k/d效率 (sh-CCR4 tdx. 第2天)

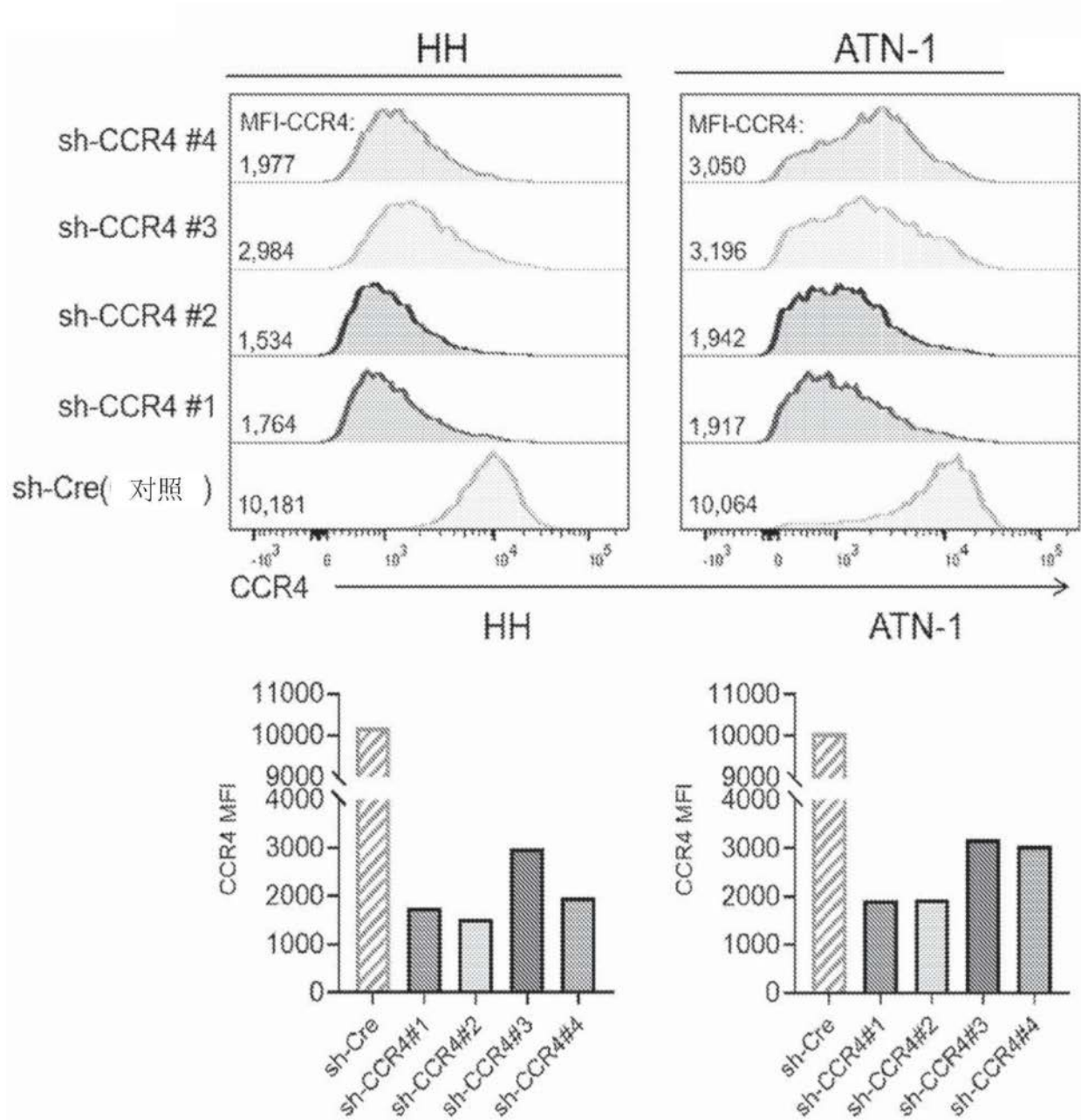


图47

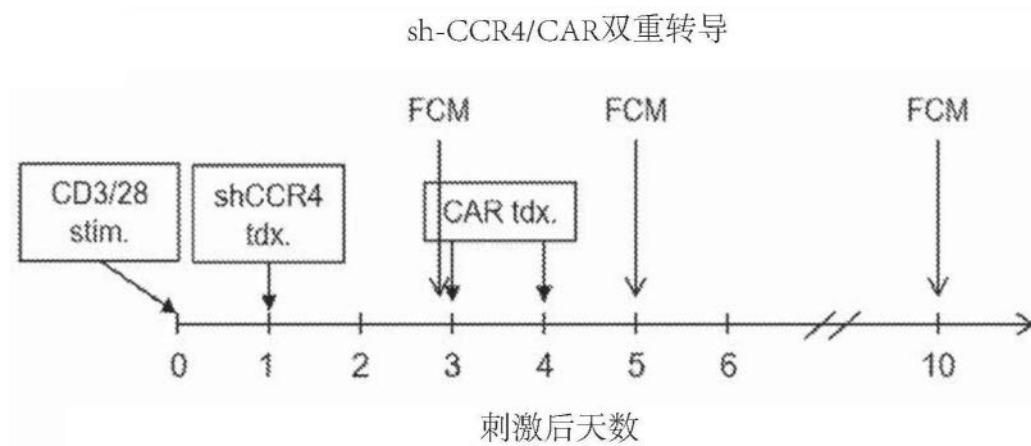


图48A

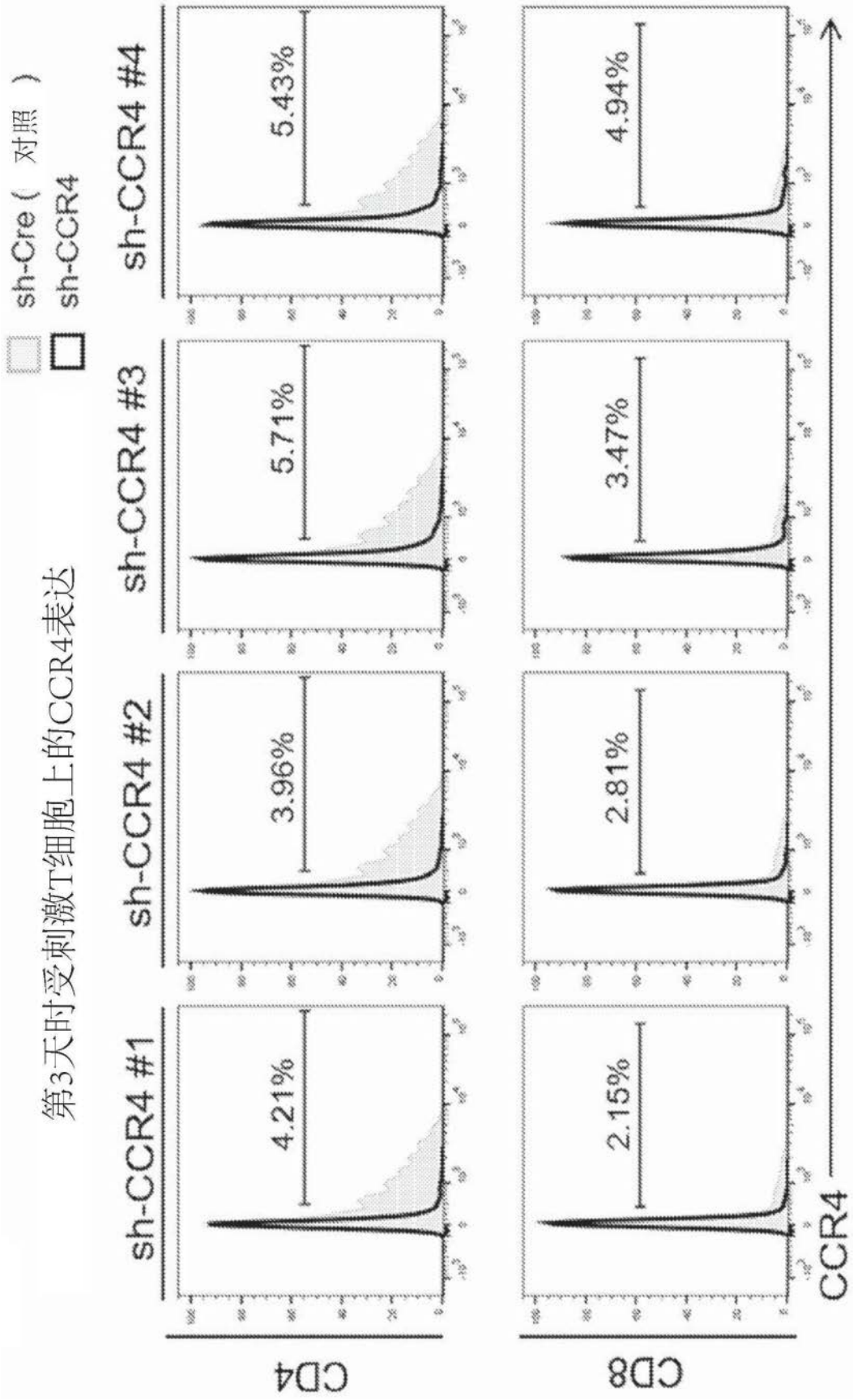


图48B

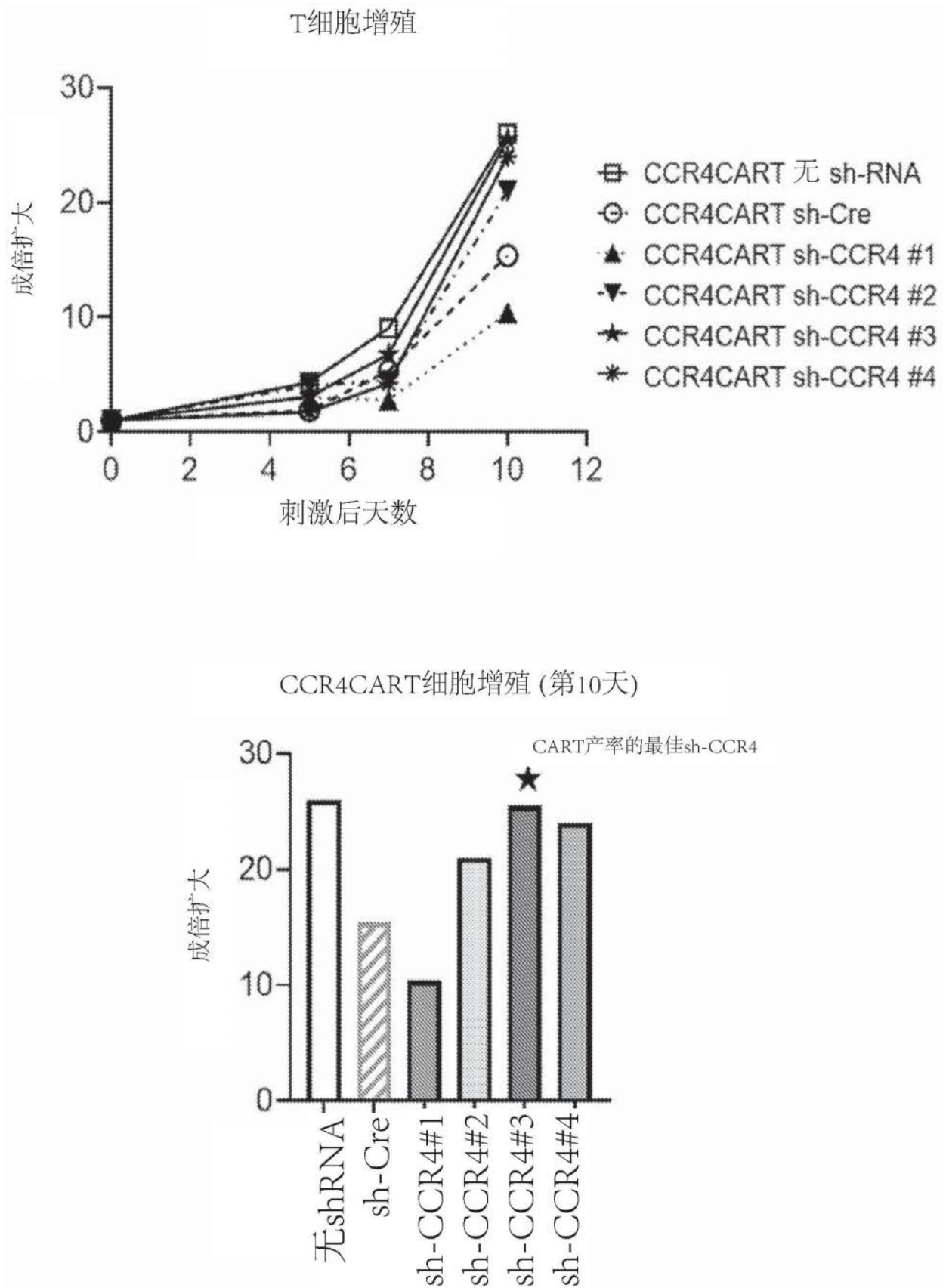


图48C

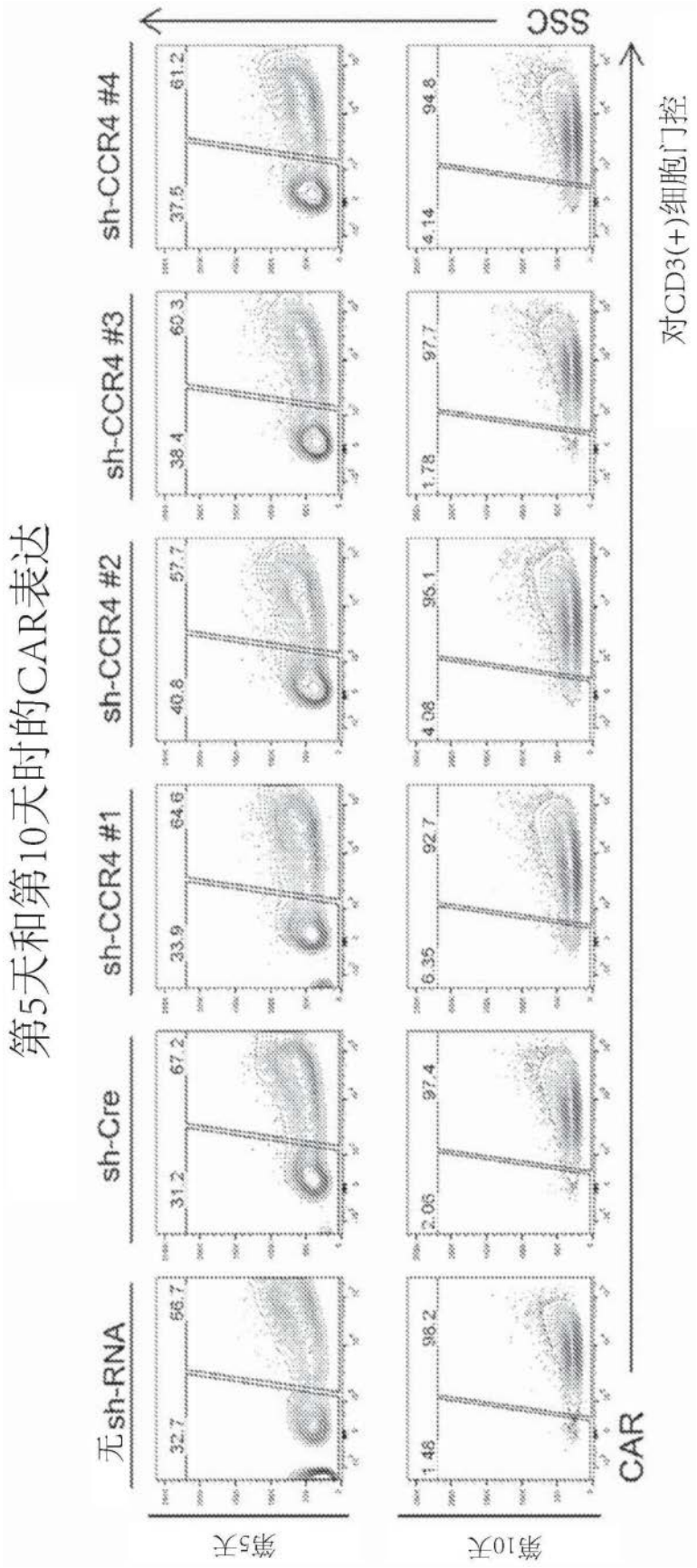


图48D

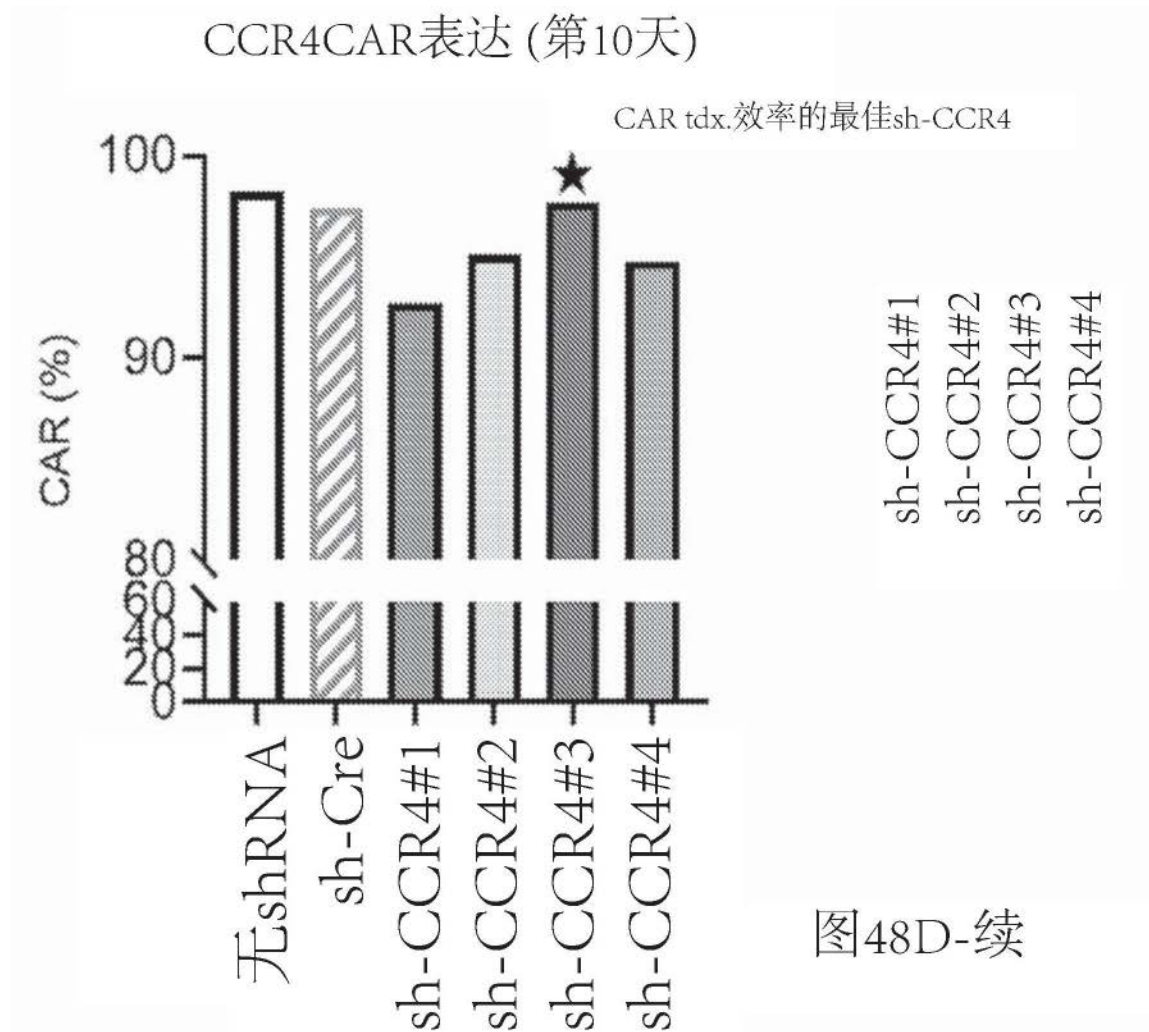


图48D-续

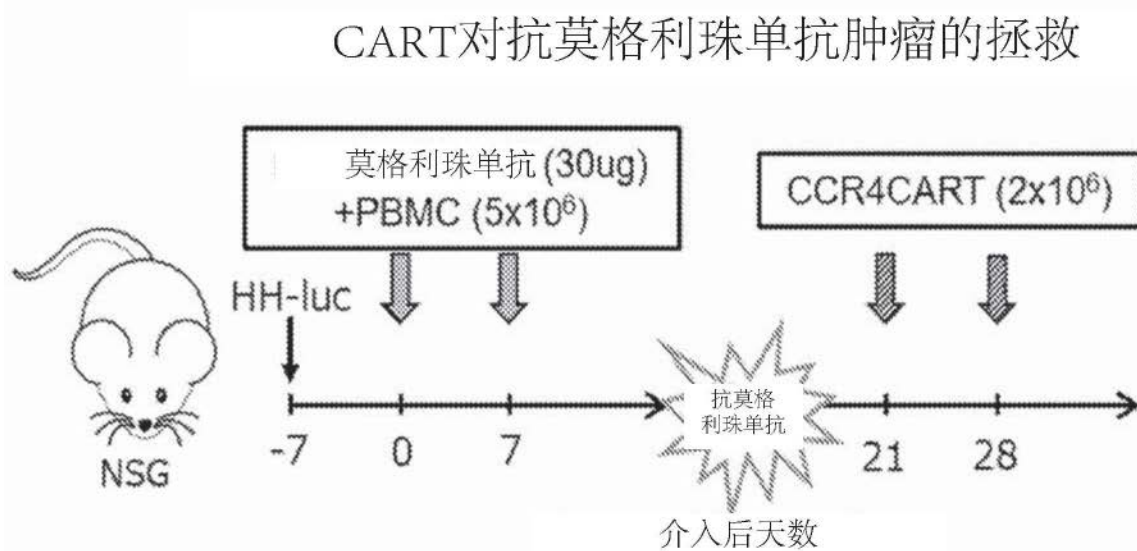


图49A

CART对抗莫格利单抗肿瘤的拯救(BLI)

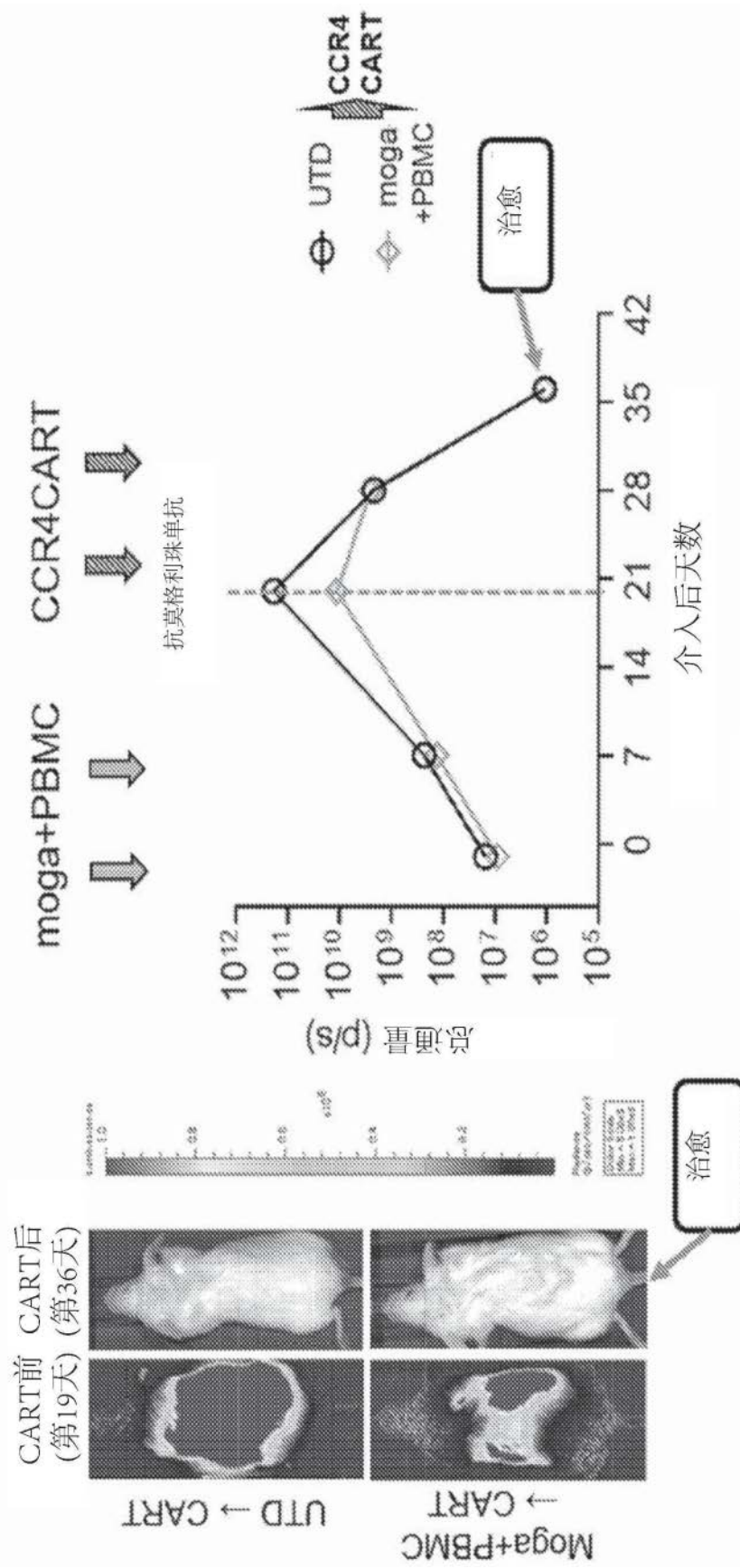


图49B

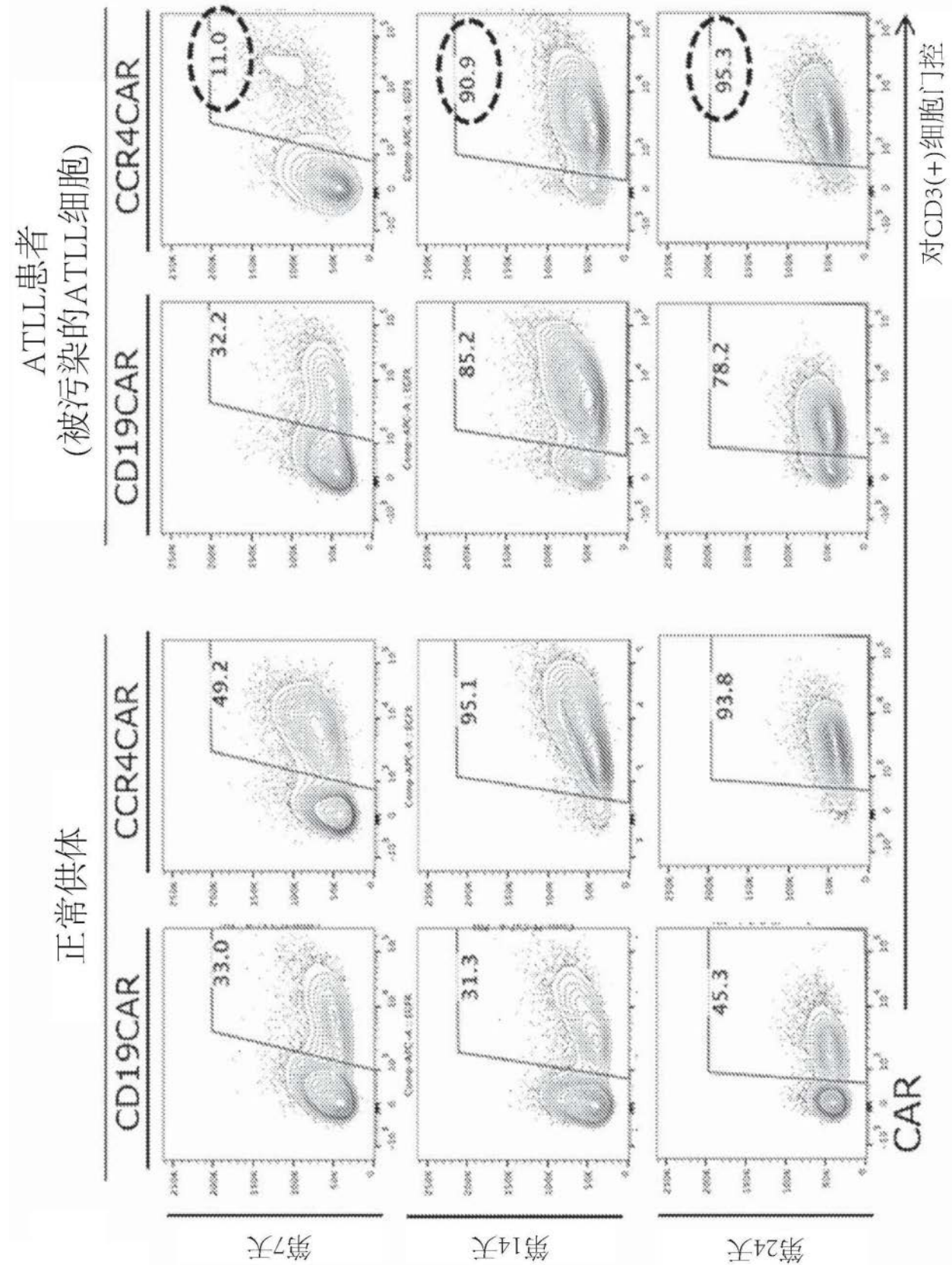


图50A

