



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I860971 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：107101870

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 01 月 18 日

(51)Int. Cl. : C07K14/705 (2006.01)

(30)優先權：2017/01/18	美國	62/447,898
2017/03/03	美國	62/467,059
2017/07/08	美國	62/530,193

(71)申請人：美商埃秀瑪生物技術公司 (美國) EXUMA BIOTECH CORP. (US)
美國(72)發明人：芙羅斯 葛傑瑞 伊恩 FROST, GREGORY IAN (US)；奧納佛 詹姆士 喬瑟夫
ONUFFER, JAMES JOSEPH (US)

(74)代理人：張耀暉；莊志強

(56)參考文獻：

WO 2016/142768A1

期刊 Ejaj Intisar et al., Adoptive T cell immunotherapy using chimeric antigen receptor against a novel cancer target Axl (VAC11P.1007). The Journal of Immunology, Vol. 192, Issue 1 Supplement 1 205.8, May 1, 2014.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：14 共 407 頁

(54)名稱

用於結合 A X L 之嵌合抗原受體、經分離之重組 T 細胞、載體及在體外活化 T 細胞的方法

(57)摘要

本發明提供結合至 Axl 及 Ror2 之嵌合抗原受體及識別 Axl 及 Ror2 之條件活性嵌合抗原受體 (CAR)。此外，本文中提供編碼此等 CAR 之核酸以及製備及使用該等 CAR 之方法，包括治療癌症，尤其是表現 Axl 及/或 Ror2 之癌症，諸如腎上皮細胞癌之方法。本發明提供經基因方式修飾以產生該等 CAR 之細胞。

The present disclosure provides chimeric antigen receptors that bind to Axl and Ror2, and conditionally active chimeric antigen receptors (CARs) that recognize Axl and Ror2. Furthermore, provided herein are nucleic acids encoding these CARs and methods of making and using the CARs, including methods of treating cancer, especially cancers that express Axl and/or Ror2, such as renal cell carcinoma. The present disclosure provides cells genetically modified to produce the CARs.

指定代表圖：

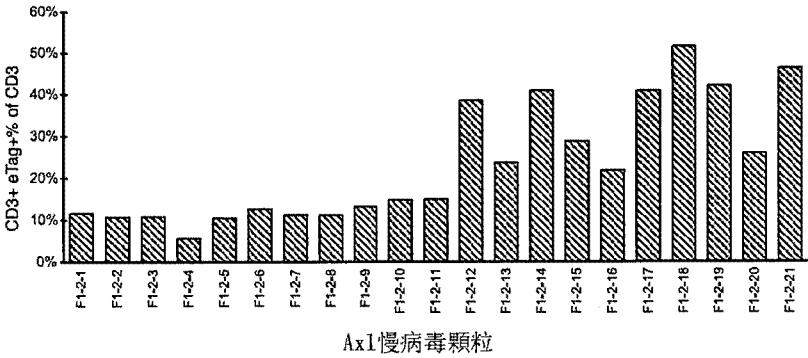


圖 1



I860971

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

用於結合 AXL 之嵌合抗原受體、經分離之重組 T 細胞、載體及在體外活化 T 細胞的方法

CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR BINDING AXL,
ISOLATED RECOMBINANT T CELLS, VECTORS AND
METHODS FOR ACTIVATING T CELLS IN VITRO

【中文】

本發明提供結合至 Axl 及 Ror2 之嵌合抗原受體及識別 Axl 及 Ror2 之條件活性嵌合抗原受體 (CAR)。此外，本文中提供編碼此等 CAR 之核酸以及製備及使用該等 CAR 之方法，包括治療癌症，尤其是表現 Axl 及/或 Ror2 之癌症，諸如腎上皮細胞癌之方法。本發明提供經基因方式修飾以產生該等 CAR 之細胞。

【英文】

The present disclosure provides chimeric antigen receptors that bind to Axl and Ror2, and conditionally active chimeric antigen receptors (CARs) that recognize Axl and Ror2. Furthermore, provided herein are nucleic acids encoding these CARs and methods of making and using the CARs, including methods of treating cancer, especially cancers that express Axl and/or Ror2, such as renal cell carcinoma. The present disclosure provides cells genetically modified to produce the CARs.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 1。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用於結合 AXL 之嵌合抗原受體、經分離之重組 T 細胞、載體及在體外活化 T 細胞的方法

CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR BINDING AXL,
ISOLATED RECOMBINANT T CELLS, VECTORS AND
METHODS FOR ACTIVATING T CELLS IN VITRO

【相關申請案之交叉參考】

[0001]

本申請案主張 2017 年 1 月 18 日申請之美國臨時申請案第 62/447,898 號、2017 年 3 月 3 日申請之美國臨時申請案第 62/467,059 號及 2017 年 7 月 8 日申請之美國臨時申請案第 62/530,193 號的權益。本段所引用之此等申請案以其全文引用之方式併入本文中。

序列表

[0002]

本申請案在此以引用之方式併入與本申請案一起提交之電子序列表之材料。電子序列表中之材料提交為在 2018 年 1 月 17 日創建之標題為「F1.002.WO.01_Seqlist.txt」的文本 (.txt) 檔案 (其檔案大小為 126 KB)，且以其全文引用之方式併入本文中。

聯合研究協議

[0003]

F1 腫瘤股份有限公司 (F1 Oncology, Inc.) 及全球生物科技公司 (BioAtla, LLC) 是涉及本文中所揭示主題之聯合研究協

議的當事人。

【技術領域】

[0004]

本發明是關於嵌合抗原受體（chimeric antigen receptors；CAR）以及嵌合抗原受體在診斷及治療方法中之用途。

【先前技術】

[0005]

在基於細胞的接受性免疫療法中，自患者分離之免疫細胞可經修飾以表現合成蛋白質，該等合成蛋白質使得細胞在隨後轉移回患者體內之後能夠執行新的治療功能。此合成蛋白質之一實例為嵌合抗原受體（CAR）。目前使用的 CAR 之一實例是胞外識別域（例如，抗原特異性靶向區或 ASTR）、跨膜域及一或多個胞內訊號傳導域的融合。在抗原接合之後，CAR 之胞內訊號傳導部分可在免疫細胞中開始活化相關之反應，諸如釋放細胞溶解分子以誘導腫瘤細胞死亡等。儘管 CAR 及 CAR-T 療法對某些類型的血癌非常有效，但仍需要針對實體腫瘤之 CAR 及 CAR-T 療法治療，迄今為止證明該等實體腫瘤極其難捉摸。

[0006]

儘管 CAR 表示治療各種疾病的令人印象深刻之方法，但 CAR 之安全性最近在臨床試驗期間通過不良事件而受到質疑。減少此等不良事件之一種方法是減少 ASTR 之在目標上腫瘤外結合。具有條件活性 ASTR 之 CAR 僅在特定條件（諸如存在於腫瘤微環境中之彼等條件）下結合至抗原且提供在目標上腫瘤外結合之減少，使得 CAR 在正常生理條件下不結合抗原。因此，此等 CAR 之副作用減少且治療可更安全地進行。

[0007]

受體酪胺酸激酶（receptor tyrosine kinases；RTK）是一種經由配位體控制的酪胺酸激酶活性調節一系列正常細胞過程之細胞表面受體。在過去 20 年，對 RTK 之去調節已經證明在癌症發展及進展中起重要作用。RTK 現經識別為預後分子生物標記且識別為腫瘤治療之目標。

[0008]

Axl 蛋白（亦稱為 Ark、UFO、Tyro-7）是激酶之 Tyro-3 家族中的 RTK。Tyro-3 受體激酶之特徵在於胞外區及細胞質激酶域中之兩個類免疫球蛋白域及 III 類雙纖維連蛋白重複之組合。Tyro-3 受體激酶之配位體是 Gas6（生長抑制特異性 6）及蛋白質 S，兩種維生素 K 依賴性蛋白質展示 43% 胺基酸序列一致性且共用相似域結構。每一蛋白質具有含 11 個 g-羧基麩胺酸殘基之 N 端 GIa 域、繼之四個類表皮生長因子（EGF）模組及由兩個串聯層黏連蛋白 G 域構成之 C 端類性激素結合球蛋白（SHBG）結構。SHBG 域對於 Tyro-3 受體激酶結合及活化是必要且充分的，而 GIa 域結合帶負電荷的膜磷脂且在 Tyro-3 激酶介導的凋亡細胞之吞噬作用中起重要作用。

[0009]

Axl 活化引起經由 PI-3 激酶/Akt 及如 Ras/Erk 及 β -連環蛋白/TCF 之其他主要路徑進行訊號傳導。Axl 在一系列正常組織，包括大腦、心臟、骨骼肌、器官囊及幾個其他器官之結締組織中，以及在單核球而不是在淋巴細胞中表現較弱。已在纖維母細胞、內皮細胞、血管平滑肌細胞及神經元之存活中描述由 Axl 誘導的 Akt 磷酸化。此外，Axl 在細胞黏著及趨化性中起作用，此是因為 Axl 剔除之動物由於血小板整合素 IIb3 之活化減少而

顯示血小板聚集體穩定性及血栓形成受損。

[0010]

Axl或其配位體 Gas6 之調節異常涉及各種人類癌症之病原。已在以下各種癌症類型中顯示Axl過表現：例如乳癌（Meric等人, *Clin. Cancer Res.*, 第 8 卷，第 361 頁至第 367 頁, 2002；Berclaz等人, *Ann. Oncol.*, 第 12 卷，第 819 頁至第 824 頁, 2001）、結腸癌（Chen等人, *Int. J. Cancer*, 第 83 卷，第 579 頁至第 584 頁, 1999；Craven等人, *Int. J. Cancer*, 第 60 卷，第 791 頁至第 797 頁, 1995）、前列腺癌（Jacob等人, *Cancer Detect. Prev.*, 第 23 卷，第 325 頁至 332 頁, 1999）、肺癌（Wimmel 等人, *Eur J Cancer*, 第 37 卷，第 2264 頁至第 2274 頁, 2001）、胃癌（Wu等人, *Anticancer Res.*, 第 22 卷，第 1071 頁至第 1078 頁, 2002）、卵巢癌（Sun等人, *Oncology*, 第 66 卷，第 450 頁至第 457 頁, 2004）、子宮內膜癌（Sun等人, *Ann. Oncol.*, 第 14 卷，第 898 頁至第 906 頁, 2003）、腎癌（Chung等人, *DNA Cell Biol.*, 第 22 卷，第 533 頁至第 540 頁, 2003）、肝細胞癌（Tsou等人, *Genomics*, 第 50 卷，第 331 頁至第 340 頁, 1998）、甲狀腺癌（Ito等人, *Thyroid*, 第 12 卷，第 971 頁至第 975, 2002；Ito等人, *Thyroid*, 第 9 卷，第 563 頁至第 567 頁, 1999）、骨肉瘤（Nakano等人, *J. Biol. Chem.*, 第 270 卷，第 5702 頁至第 5705 頁, 2003）、黑色素瘤（van Ginkel等人, *Cancer Res.*, 第 64 卷，第 128 頁至第 134 頁, 2004）；在頭頸部鱗狀細胞瘤（Green等人, *Br J. Cancer.*, 第 94 卷，第 1446 頁至第 1451 頁, 2006）、卵巢癌、腎癌、神經膠質瘤、內分泌腺癌、胰腺癌、淋巴癌、腦癌、肝癌、腎上皮細胞癌、腎透明細胞癌、膀胱癌、直腸癌、宮頸鱗狀細胞瘤中；且另外在淋巴瘤及各種血癌（包括慢性脊

髓性白血病) (Janssen等人, *Oncogene*, 第 6 卷, 第 2113 頁至第 2120 頁, 1991; Braunger等人, *Oncogene*, 第 14 卷, 第 2619 頁至第 2631 頁, 1997; O'Bryan等人, *Mol. Cell. Biol.*, 第 11 卷, 第 5016 頁至第 5031 頁, 1991) 以及急性骨髓性白血病 (Rochlitz 等人, *Leukemia*, 第 13 卷, 第 1352 頁至第 1358 頁, 1999) 中。

[0011]

Axl表現由經目標化學療法藥物誘導, 且藥物誘導之Axl表現在急性骨髓性白血病 (Hong等人, *Cancer Letters*, 第 268 卷, 第 314 頁至第 324 頁, 2008) 中賦予對化學療法之抗性, 以及在胃腸道基質腫瘤 (Mehadevan等人, *Oncogene*, 第 26 卷, 第 3909 頁至第 3919 頁, 2007) 及乳癌 (Liu等人, *Cancer Research*, 第 281 卷, 第 6871 頁至第 6878 頁, 2009) 中分別賦予對伊馬替尼 (imatinib) 及拉帕替尼/赫賽汀 (Lapatinib/Herceptin) 之抗性。

[0012]

此外, 已識別到Axl涉及腫瘤轉移, 此是因為相比於非侵入性細胞, Axl在侵襲性乳癌細胞株中上調。在活體外, 發現Axl活性是遷移及侵入所必需的, 且此活性可由抗體治療抑制 (WO 04/008147)。類似地, Axl在活體內的活性經由Axl之顯性負突變體之表現 (Vajkoczy, P.等人, *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A.*, 第 103 卷, 第 5799 頁至第 5804 頁, 2005) 或由siRNA介導的Axl之下調 (Holland等人, *Cancer Res.*, 第 65 卷, 第 9294 頁至第 9303 頁, 2005) 在鼠異種移植試驗中防止皮下及原位細胞生長而取消。

[0013]

因此, 已建議將抗Axl單株抗體用於癌症治療中。舉例而言, 涉及抗Axl抗體之出版物包括 WO 2009/063965、WO

2009/062690、WO 2011/014457、US 2014/0227283 及美國專利第 8,853,369 號。US 2014/0227283 揭示單株抗 Ax1 抗體及其在診斷及治療方法中之用途。WO 2009/062690 揭示結合至 Ax1 蛋白之胞外域且可至少部分抑制 Ax1 活性之抗體。然而，即使對於已識別出單株抗體且可用作試劑之目標（諸如 Ax1），亦存在許多挑戰，這使得極難產生針對 Ax1 或 Ror2 之條件活性的 CAR。

[0014]

亦稱為受體酪胺酸激酶類孤兒受體 2 之另一種 RTK、Ror2 是膜結合，該膜結合在正常骨骼與軟骨發育期間通過與 Wnt5A 糖蛋白結合而由非典型 Wnt 訊號傳導活化。Ror2 僅具有一個跨膜域，該跨膜域將其胞外域及胞內域分開。已知 Ror2 在各種器官及組織之正常發育期間起決定性作用。在哺乳動物中，Ror2 缺陷及 Wnt5A 缺陷之小鼠在發育形態發生期間呈現出相似的異常，反應其在集中延伸運動及平面細胞極化中的缺陷。此外，人類 Ror2 基因之突變導致遺傳性骨骼疾病，主要為 B 型短趾畸形及隱性 Robinow 症候群。發現 Ror2 介導極化細胞遷移，且 Ror2 之功能障礙引起可遺傳的骨骼疾病及腫瘤侵入（Minami 等人的「Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases」, *Dev Dyn.*, 第 239 卷, 第 1 頁至第 15 頁, 2010）。另外，Debebe 等人的（「Ror2 as a therapeutic target in cancer」, *Pharmacol. Ther.*, 第 50 卷, 第 143 頁至第 148 頁, 2015）揭示 Ror2 介導典型及非典型訊號傳導路徑兩者。

[0015]

據報導，Ror2 具有原致瘤（pro-tumorigenic）作用。US 2014/0322234 揭示 Ror2 在各種癌症中之表現及活性與正常組織

不同。由此，認為Ror2之調節異常在各種人類癌症之病原中起作用。US 2014/0322234亦預期針對Ror2之抗體可用於癌症之診斷及癌細胞生長之抑制中。舉例而言，可將此類抗體結合至對表現Ror2之癌細胞具有高度細胞毒性之細胞毒劑，使得細胞毒劑可有效殺死癌細胞。根據Ror2在癌症中之表現模式，Ror2基因亦可用於癌症分類。

[0016]

Ror2涉及癌症之發展及進展（「The dual role of the novel Wnt receptor tyrosine kinase, Ror2, in human carcinogenesis」, *International Journal of Cancer*, 第133卷，第779頁至第787頁, 2013）。具體而言，已發現Ror2在包括結腸癌、肝細胞癌、轉移性黑色素瘤及腎上皮細胞癌之多種癌症的癌變中起關鍵作用。舉例而言，Ror2在骨肉瘤、黑色素瘤、腎上皮細胞癌、前列腺腫瘤、頭頸鱗狀細胞瘤、結腸癌、乳癌、淋巴瘤、白血病、甲狀腺癌、內分泌腺腫瘤、腦癌、卵巢癌、腎乳頭狀、肺癌、胰腺癌、肝癌、腎透明細胞癌、膀胱癌、子宮內膜癌、直腸癌、宮頸鱗狀細胞癌及基質腫瘤中過表現。在大多數此等癌症類型中，Ror2表現與更具侵襲性之癌症狀態相關聯。因此Ror2具有藉由抑制Wnt訊號傳導路徑而成為癌症治療之藥物目標的潛力。

[0017]

仍需要一種有效治療，其利用免疫系統之力量對抗癌症，但其已減少或消除目標上腫瘤外以及目標外效應。雖然針對Ror2及Axl之單株抗體可商購，但需要包括靶向條件活性之Ror2或Axl之抗體片段的CAR，其僅在特定環境（諸如癌症微環境）中有效地靶向表現Ror2或Axl之細胞。創建此類條件活性之CAR提出眾多挑戰。舉例而言，必須創建且識別出抗體片段，該等

抗體片段不僅在當其於T細胞或NK細胞之表面上表現時結合Ax1或Ror2作為CAR之一部分，且其另外具有識別暴露於癌細胞上之抗原決定位的能力。此外，相比於正常生理pH，此類CAR以條件活性方式更多地結合至其目標，尤其是在腫瘤之酸性pH下。另外，當與其目標結合時，此類候選CAR必須活化表現CAR之T細胞或NK細胞以表現細胞毒性功能。因此，對含有此抗體片段之CAR有許多要求，以幫助解決目前CAR-T方法所引出的問題。針對Ax1或Ror2之此條件活性CAR將有望使用CAR-T療法來治療實體癌症，由此克服當前CAR-T療法之主要限制。

【發明內容】

[0018]

本發明提供結合至Ax1及/或Ror2之嵌合抗原受體（CAR）及包含編碼該等CAR之核苷酸序列的核酸以及結合至Ax1及Ror2之條件活性生物（conditionally active biologic；CAB）CAR。本發明提供經基因修飾以產生CAR之細胞及用於製備此類細胞之方法。本發明之CAR可以各種方法使用，亦提供該等方法，該等包括用於在特定條件下，諸如低於臨限值之pH下活化免疫細胞之方法；用於執行接受性細胞療法，諸如CAR療法，例如針對癌症（例如腎上皮細胞癌）之CAR療法之方法。

[0019]

貫穿本發明提供在本文中所提供之態樣及實施例之細節。為清楚起見，本發明內容部分不旨在且不應解釋為限制本文中所提供之發明之範圍。

【圖式簡單說明】

[0020]

圖 1 提供顯示基於eTag表現之FACS分析之CD3⁺細胞之轉導

百分比的條形圖。

[0021]

圖 2A至圖 2F顯示由具有野生型ASTR之表現識別Ax1之對照CAR的T細胞（圖 2A）及表現識別Ax1之候選CAB-CAR的T細胞（該T細胞具有識別Ax1之條件活性ASTR）（圖 2B至圖 2F）在pH 6.7 及pH 7.4 下對CHO-Ax1細胞之即時殺死分析的結果。效應物與目標比率在圖 2A及圖 2B中是 3:1，且在圖 2C至圖 2F中是 1:1。

[0022]

圖 3A至圖 3J顯示由具有野生型ASTR之表現識別Ror2 之對照CAR的T細胞（圖 3A）及表現識別Ror2 之候選CAB-CAR的T細胞（該T細胞具有識別Ror2 之條件活性ASTR）（圖 3B至圖 3J）在pH 6.7 及pH 7.4 下對CHO-Ror2 細胞之即時殺死分析的結果。效應物與目標比率是 1:1。

[0023]

圖 4A顯示在不同pH下表現本文中所提供的針對Ax1之條件活性CAR中之一者的T細胞對CHO-Ax1細胞之即時殺死分析的代表性結果。圖 4B提供關於與圖 4A相同之CAB-CAR在如所指出的不同pH下在 20 小時時間點的裂解結果。

[0024]

圖 5A顯示在不同pH下表現本文中所提供的針對Ror2 之條件活性CAB-CAR中之一者的T細胞對CHO-Ror2 細胞之即時殺死分析的代表性結果。圖 5B提供關於與圖 5A相同之CAB-CAR在如所指出的不同pH下在 20 小時時間點的裂解結果。

[0025]

圖 6A顯示在pH 6.7 及pH 7.4 下由表現針對Ax1之條件活性

CAB-CAR中之一者的T細胞對人類Caki-1 細胞之即時殺死分析的結果。圖 6B顯示在pH 6.7 及pH 7.4 下由表現針對Ror2 之條件活性CAB-CAR中之一者的T細胞對人類HEK293 細胞之即時殺死分析的結果。

[0026]

圖 7A顯示用不同濃度的西妥昔單抗（Cetuximab）或對照（同位素）處理之後用表現eTag之慢病毒表現載體轉導之PBMC的細胞消耗結果。圖 7B提供用西妥昔單抗或對照（同位素）處理之後用表現eTag之慢病毒表現載體以轉導（E）細胞與非轉導（T）細胞轉導的不同比率之PBMC的細胞消耗結果。

[0027]

圖 8A至圖 8D顯示在pH 6.7 或pH 7.4 下在具有或不具有共培育之不同細胞的培養基中細胞介素含量的條形圖。所使用之各種細胞是表現GMCSF訊號傳導序列及eTag（F1-0-01）之T細胞、表現Ax1 CAB-CAR（F1-2-15）之T細胞、表現Ror2 CAB-CAR（F1-1-15）之T細胞、CHO細胞、表現Ax1（CHO-AXL）之CHO細胞及表現Ror2（CHO-ROR2）之CHO細胞。圖 8A顯示單獨的F1-0-01 或F1-2-15 T細胞或與CHO或CHO-Ax1共培育時之培養基中的IL-2 之含量。圖 8B顯示單獨的F1-0-01 或F1-2-15 T細胞或與CHO或CHO-Ax1共培育時之培養基中的IFN- γ 之含量。當CHO或CHO-Ax1細胞在不存在效應T細胞之情況下培育時，培養基培養基中之細胞介素含量在圖 8A及圖 8B中亦作為對照顯示。圖 8C顯示單獨的F1-0-01 或F1-1-15 T細胞或與CHO或CHO-Ror2 共培育時之培養基中的IL-2 之含量。圖 8D顯示單獨的F1-0-01 或F1-1-15 T細胞或與CHO或CHO-Ror2 共培育時之培養基中的IFN- γ 之含量。當CHO或CHO-Ror2 細胞在不存在效應T

細胞之情況下培育時，培養基培養基中之細胞介素含量在圖 8C 及圖 8D中亦作為對照顯示。

[0028]

圖 9A至圖 9C顯示在具有或不具有用pH調節藥用試劑處理之情況下，由表現本文中所提供的針對Ax1之條件活性CAB-CAR中之一者的T細胞對CHO-Ax1細胞之即時殺死分析的代表性結果。在圖 9A中，培養基最初是在pH 6.7 下，且在由箭頭所指示之時間處，分別用NaHCO₃ 或不用NaHCO₃ 處理實驗槽（實線）及對照細胞（虛線）。在圖 9B中，培養基最初是在pH 6.7 下，且在由箭頭所指示之時間處，分別用NaOH或不用NaOH處理實驗槽（實線）及對照細胞（虛線）。在圖 9C中，培養基最初是在pH 7.4 下，且分別用HCl或不用HCl處理實驗槽（實線）及對照細胞（虛線）。

[0029]

圖 10 為顯示在投與PBS或碳酸氫鹽之前及之後之CHO異種移植腫瘤攜帶小鼠中之ProSense FAST探針中的RFU百分比的圖。

[0030]

圖 11A顯示靜脈內投與用含有編碼F1-0-01(eTag)或F1-1-15之核酸的慢病毒顆粒轉導之PBS或人類T細胞（針對Ror2 之條件活性CAB-CAR中之一者）的B-NSG小鼠中之CHO腫瘤之平均腫瘤體積。圖 11B顯示靜脈內投與用含有編碼F1-0-01 或F1-1-15之核酸的慢病毒顆粒轉導之PBS或人類T細胞的B-NSG小鼠中之CHO-Ror2 腫瘤之平均腫瘤體積。

[0031]

圖 12A顯示腫瘤內投與用含有編碼F1-0-01(eTag)或F1-2-15

或 F1-2-22 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 PBS 或人類 T 細胞的 B-NSG 小鼠中之 CHO 腫瘤之平均腫瘤體積。F1-2-15 及 F1-2-22 編碼針對 Ax1 之條件活性 CAB-CAR 中之兩者。圖 12B 顯示腫瘤內投與用含有編碼 F1-0-01、F1-2-15 或 F1-2-22 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 PBS 或人類 T 細胞的 B-NSG 小鼠中之 CHO-Ax1 腫瘤之平均腫瘤體積。

[0032]

圖 13A 顯示靜脈內投與用含有編碼 F1-0-01(eTag)或 F1-2-15 或 F1-2-22 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 PBS 或人類 T 細胞的 B-NSG 小鼠中之 CHO 腫瘤之平均腫瘤體積。F1-2-15 及 F1-2-22 編碼針對 Ax1 之條件活性 CAB-CAR 中之兩者。圖 13B 顯示靜脈內投與用含有編碼 F1-0-01、F1-2-15 或 F1-2-22 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 PBS 或人類 T 細胞的 B-NSG 小鼠中之 CHO-Ax1 腫瘤之平均腫瘤體積。

[0033]

圖 14A 顯示靜脈內投與用含有編碼 F1-0-01(eTag)或 F1-2-15 或 F1-2-22 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 PBS 或人類 T 細胞的 B-NSG 小鼠中之 CHO 腫瘤之平均腫瘤體積。F1-2-1 及 F1-2-22 編碼針對 Ax1 之條件活性 CAB-CAR 中之兩者。圖 14B 顯示靜脈內投與用含有編碼 F1-0-01、F1-2-15 或 F1-2-22 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 PBS 或人類 T 細胞的 B-NSG 小鼠中之 CHO-Ax1 腫瘤之平均腫瘤體積。圖 14A 及圖 14B 中經投與 T 細胞之小鼠亦在前 3 天的每天接受在遠離腫瘤之對側位點皮下注射 IL-2 (50,000 IU)。

【實施方式】

定義

[0034]

如本文中所使用之術語「嵌合抗原受體」或「CAR」是指基因改造之受體，其將抗原特異性移植至細胞上，例如T細胞、NK細胞、巨噬細胞及幹細胞。本發明之CAR可包括至少一個抗原特異性靶向區(ASTR)、鉸鏈或柄域(亦即胞外柄域(ESD))、跨膜域(TM)、一或多個共刺激域(CSD)及胞內活化域(IAD)。在某些實施例中，ESD及/或CSD是視情況選用的。本文中一些實施例中所提供之CAR具有明確敘述的域(例如CD3Z胞內活化域)。針對此類明確敘述之域，意謂該域保留野生型結構域之活性，使其可有效地用於CAR(亦即，CAR保留結合目標之能力且作為回應，經由發現於CAR中之胞內活化域傳輸訊號) 中，且在提供此類活性之結構域之部分上與該特定域之已知人類序列具有至少 80%序列一致性。舉例而言，CD3Z胞內域在胺基酸水準上與已知的人類CD3Z序列具有至少 80%序列一致性，且當發現於CAR上時保留了在將CAR之ASTR結合至其目標時傳輸訊號之能力。在另一實施例中，CAR為對兩種不同抗原或抗原決定位具有特異性之雙特異性CAR。在ASTR與目標抗原特異性結合之後，IAD活化胞內訊號傳導。舉例而言，IAD可以非MHC限制的方式利用抗體之抗原結合特性將T細胞特異性及反應性重定向於所選擇之目標。非MHC限制的抗原識別給與表現CAR之T細胞不依賴於抗原處理而識別抗原，因此繞過腫瘤逃逸的主要機制之能力。此外，當在T細胞中表現時，CAR有利地不與內源性T細胞受體(TCR) α 鏈及 β 鏈二聚。

[0035]

如本文中關於CAR或ASTR所使用之術語「條件活性」是指具有較低結合親和力，或在說明性實施例中，在目標微環境中之條件下具有比在正常生理環境中之條件下針對一或多種目標

抗原之更高結合親和力之CAR或ASTR。在說明性實施例中，本文中所提供之條件活性CAR相比於在非腫瘤微環境或正常條件中之條件下，在腫瘤微環境或活體外腫瘤替代分析中的條件下更具活性。腫瘤微環境中之條件包括與非腫瘤微環境相比較低之pH、較高濃度之乳酸鹽及丙酮酸鹽、低氧、較低濃度之葡萄糖及略微較高之溫度。舉例而言，在某些實施例中，條件活性CAR在正常體溫下實際上無活性，但在腫瘤微環境中在較高溫度下具有活性。在又一態樣中，條件活性CAR在正常氧合血液中具有較低活性，但在存在於腫瘤中之較少氧合環境下具有較高活性。在本文中所提供之一說明性實施例中，條件活性CAR在正常生理pH 7.2 至 7.8 中具有較少活性，但在存在於腫瘤微環境中之酸性pH 6.0 至 6.8 下具有較高活性。在熟習此項技術者已知的腫瘤微環境中存在亦可用作本發明中之條件的其他條件，在此等條件下條件活性CAR及ASTR具有不同之結合親和力。條件活性CAR在本文中可稱為「條件活性生物CAR」或「CAB-CAR」及「受微環境限制之生物CAR」或「MRB-CAR」。

[0036]

如本文中所使用之術語「微環境」意謂與其他組織區或身體區具有恆定或暫時的、物理的或化學的差異之組織或身體之任何部分或區。針對腫瘤，如本文中所使用之「腫瘤微環境」是指腫瘤存在於其中之環境，該環境為腫瘤內之非細胞區域，且正好位於腫瘤組織外部之區域但並不屬於癌細胞自身之胞內區室。腫瘤與腫瘤微環境密切相關，且不斷地相互作用。腫瘤可改變其微環境，且該微環境可影響腫瘤如何生長及擴散。通常，腫瘤微環境具有在 5.8 至 7.0 範圍內，更普遍在 6.0 至 6.8 範圍內，在 6.2 至 6.8 範圍內之低pH。在另一方面，正常生理pH

是在 7.2 至 7.8 範圍內。亦已知腫瘤微環境具有與血漿相比較低濃度之葡萄糖及其他養分，但較高濃度之乳酸。此外，腫瘤微環境可具有比正常生理溫度高 0.3 至 1°C 之溫度。腫瘤微環境已論述於Gillies等人之「MRI of the Tumor Microenvironment」, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 第 16 卷，第 430 頁至第 450 頁，2002 中，其藉此以其全文引用之方式併入本文中。術語「非腫瘤微環境」是指位點而非腫瘤處之微環境。

[0037]

本文中互換地使用之術語「聚核苷酸」及「核酸」是指任何長度之聚合形式之核苷酸（核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸）。因此，此術語包括但不限於：單鏈、雙鏈或多鏈的DNA或RNA、基因組DNA、cDNA、DNA-RNA雜交體，或包含嘌呤鹼基及嘧啶鹼基或其他天然、以化學方式或生物化學方式修飾之非天然或衍生之核苷酸鹼基的聚合物。

[0038]

術語「抗體」及「免疫球蛋白」包括任何同型之抗體或免疫球蛋白；以及當抗體之重鏈及輕鏈二者均存在時，保留與抗原決定位（通常是與完整抗體相同的抗原決定位）特異性結合之抗體片段，包括（但不限於）Fab、Fab'、Fab'-SH、(Fab')₂ Fv、scFv、二價scFv及Fd片段；嵌合抗體；人源化抗體；單鏈抗體以及包含抗體及非抗體蛋白質之抗原特異性靶向區之融合蛋白。

[0039]

「抗體片段」包括完整抗體之一部分，例如完整抗體之抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙抗體；線性抗體（Zapata等人，Protein Eng.

8(10):1057-1062 (1995))；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多特異性抗體。抗體之木瓜蛋白酶消化產生兩個相同的抗原結合片段（稱為「Fab」片段，每一者具有單個抗原結合位點）及一殘餘「Fe」片段（一種反映容易結晶之能力的指示）。胃蛋白酶處理產生具有兩個抗原結合位點且仍能夠交聯抗原之 $F(ab')_2$ 片段。

[0040]

「單鏈Fv」、「scFv」或「sFv」抗體片段包括抗體之 V_H 域及 V_L 域，其中此等域存在於單個多肽鏈中。在一些實施例中，Fv多肽進一步包括在 V_H 域與 V_L 域之間的多肽連接子，其使得sFv能夠形成針對抗原結合之所要結構。對於sFv之綜述，參見 *Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第 269 至第 315 頁 (1994)。

[0041]

如本文中所使用，術語「親和力（affinity）」是指兩種試劑之可逆結合的平衡常數，且被表達為解離常數（Kd）。親和力可比抗體針對不相關胺基酸序列之親和力高至少 1 倍、至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍、至少 10 倍、至少 20 倍、至少 30 倍、至少 40 倍、至少 50 倍、至少 60 倍、至少 70 倍、至少 80 倍、至少 90 倍、至少 100 倍或至少 1000 倍，或更高。抗體對於靶蛋白之親和力可為（例如）約 100 奈莫耳（nM）至約 0.1 nM、約 100 nM至約 1 皮莫耳（pM）、或約 100 nM至約 1 飛莫耳（fM）或更高。如本文中所使用，術語「親合力（avidity）」是指兩種或大於兩種試劑之複合物在稀釋後對於解離之抗性。關於抗

體及/或抗原結合片段，術語「免疫反應性」及「優先結合」在本文中互換地使用。

[0042]

術語「結合（binding）」是指歸因於例如共價相互作用、靜電相互作用、疏水相互作用及離子相互作用及/或氫鍵相互作用（包括諸如鹽橋鍵及水橋鍵之相互作用）而在兩個分子之間的直接締合。非特異性結合應是指親和力低於約 10^{-7} M 之結合，例如親和力低於 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M 等之結合。

[0043]

如本文中所使用，術語「鉸鏈區」是指提供結構性可撓性且與側翼多肽區間隔的可撓性多肽連接區（本文中亦稱為「鉸鏈」或「間隔」），且可由天然或合成多肽構成。衍生自免疫球蛋白（例如，IgG1）之「鉸鏈區」一般被定義為自人類IgG1之Glu216 拉伸至Pro230(Burton (1985) *Molec. Immunol.*, 22:161-206)。可藉由將形成重鏈間二硫鍵（S-S）之第一個半胱胺酸殘基與最後一個半胱胺酸殘基置於相同位置來將其他IgG同型之鉸鏈區與IgG1 序列對準。鉸鏈區可為天然存在或非天然存在的，其包括（但不限於）如美國專利第 5,677,425 號中所揭示之經改變之鉸鏈區。鉸鏈區可包括衍生自與CH1域之類別或子類別不同的類別或子類別之抗體的完整鉸鏈區。術語「鉸鏈區」亦可包括衍生自CD8、CD28 或在提供可撓性且與側翼區間隔時提供類似功能之其他受體的區。

[0044]

「經分離」之多肽為已經識別且自其天然環境之組分分離及/或回收之多肽。其天然環境之雜質組分為將干擾多肽之診斷或治療用途之材料，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白

質溶質。在一些實施例中，多肽將（1）純化至按抗體重量計高於 90%、高於 95%或高於 98%，如利用勞立法（Lowry method）所測定，例如，高於 99 重量%，（2）藉助於旋轉杯定序儀純化至足以獲得N端或內部胺基酸序列之至少 15 個殘基之程度，或（3）利用十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳（SDS-PAGE）在還原條件或非還原條件下使用考馬斯（Coomassie）藍或銀染料純化至均一性。經分離之多肽包括重組細胞內之原位多肽，因為多肽之天然環境之至少一種組分將不存在。在一些情況下，經分離之多肽將藉由至少一個純化步驟來製備。

[0045]

如本文中所使用之術語「免疫細胞」一般包括衍生自骨髓中產生之造血幹細胞（HSC）之白血細胞（白血球）。「免疫細胞」包括（例如）淋巴球（T細胞（亦即T淋巴球）、B細胞、自然殺手（NK）（CD3- CD56+）細胞）及骨髓衍生細胞（嗜中性細胞、嗜酸性粒細胞、嗜鹼性粒細胞、單核球、巨噬細胞、樹突狀細胞）。「T細胞」包括表現CD3 之所有類型之免疫細胞，其包括輔助T細胞（CD4⁺細胞）、細胞毒性T細胞（CD8⁺細胞）、調節性T細胞（Treg）及 γ - δ T細胞以及NK T細胞（CD3+及CD56+）。熟練的業內人士將瞭解，如貫穿本發明所使用，T細胞及/或NK細胞可包括僅T細胞，僅NK細胞，或T細胞及NK細胞兩者。在本文所提供之某些說明性實施例及態樣中，T細胞經活化及轉導。此外，在本文中所提供之某些說明性組合實施例及態樣中提供T細胞。「細胞毒性細胞」包括CD8⁺ T細胞、自然殺手（NK）細胞、NK-T細胞、 γ δ T細胞及嗜中性細胞（其為能夠介導細胞毒性反應之細胞）。

[0046]

如本文中所使用，術語「幹細胞」一般包括分化多能或多潛能幹細胞（**pluripotent or multipotent stem cell**）。「幹細胞」包括（例如）胚胎幹細胞（**ES**）、間充質幹細胞（**MSC**）、誘導型分化多能性幹細胞（**iPS**）及定型的先驅細胞（**committed progenitor cells**）（造血幹細胞（**HSC**）、骨髓衍生細胞等）。

[0047]

除非另外說明，否則本文中所使用之術語「**Axl**」是指來自任何脊椎動物來源的任何天然**Axl**，包括諸如靈長類動物（例如人類）及齧齒類動物（例如小鼠及大鼠）之哺乳動物。該術語涵蓋「全長」、未處理之**Axl**以及由細胞中之處理所產生的任何類型之**Axl**。該術語亦涵蓋**Axl**之天然存在的變體，例如剪接變體或等位基因變體。人類**Axl**之胺基酸序列在此項技術中是熟知的，且可自諸如**GenBank**的公共資料庫中獲得。

[0048]

如本文中所使用之術語「**Axl**活化」是指**Axl**受體之活化或磷酸化。通常，**Axl**活化引起訊號轉導（例如，由使**Axl**或基質多肽中酪胺酸殘基磷酸化的**Axl**受體之胞內激酶域所引起之訊號轉導）。**Axl**活化可藉由將**Axl**配位體（**Gas6**）與所關注之**Axl**受體結合來介導。**Gas6**與**Axl**結合可活化**Axl**之激酶域，且藉此引起**Axl**中酪胺酸殘基之磷酸化及/或額外基質多肽中酪胺酸殘基之磷酸化。

[0049]

本文中所使用之術語「**Axl**介導之抗凋亡」是指防止人類細胞，較佳但不限於來自程式化細胞之人類癌細胞死亡（凋亡）之所有涉及**Axl**的過程。具體而言，其是指經由生長因子停止、低氧、暴露於化學治療劑或輻射或**Fas/Apo-1**受體介導的訊號傳

導之啟動來防止人類細胞，較佳但不限於人類癌細胞誘導細胞凋亡，且由Ax1之非催化或催化活性，較佳包括Ax1磷酸化及/或Ax1介導之訊號轉導刺激或介導之過程。

[0050]

如本文中所使用之術語「Ror2」是指Genbank寄存編號AAI30523中所顯示之受體酪胺酸激酶類孤兒受體2，其是具有活體外蛋白激酶活性之預計943個胺基酸的蛋白質。許多受譜系限制的受體酪胺酸激酶最初經識別為同源於已知受體之『孤兒』，且隨後僅用於識別其未知的生長因子。DeChiara等人（2000）識別出由Ror2編碼之一種此類孤兒。

[0051]

如本文中所使用，術語「治療（treatment/treating）」及類似者是指獲得所要藥理學及/或生理學效果。該效果就完全或部分地預防疾病或其症狀而言可為預防性的，及/或就部分或完全治癒疾病及/或由疾病引起之不良效應而言可為治療性的。如本文中所使用之「治療」涵蓋哺乳動物中之（例如，人類中之）疾病之任何治療，且包括：（a）預防在易患疾病但尚未被診斷為患有其之個體中發生疾病；（b）抑制疾病，亦即，遏止其發展；及（c）減輕疾病，亦即，引起疾病消退。

[0052]

如本文中互換地使用，術語「受試者（individual）」、「個體（subject）」、「宿主」及「患者」是指哺乳動物，其包括（但不限於）人類、鼠類（例如，大鼠、小鼠）、兔類（例如，兔）、非人類靈長類、人類、犬、貓、有蹄類動物（例如，馬、牛、綿羊、豬、山羊）等。

[0053]

「治療有效量」或「有效量」是指在向哺乳動物或其他個體投與以用於治療疾病時足以影響疾病之此類治療的試劑之量或兩種試劑之組合量。「治療有效量」將視試劑、疾病及其嚴重程度以及待治療之個體之年齡、體重等而變化。

[0054]

如本文中所使用，術語「進化（evolution/evolving）」是指使用一或多種突變方法產生編碼不同多肽之不同聚核苷酸，該多肽自身為經改良生物分子及/或有助於產生另一經改良生物分子。

[0055]

「生理」條件、「正常」條件或「正常生理」條件為諸如但不限於以下之條件：溫度、pH、滲透壓、重量滲透莫耳濃度、氧化應力及電解質濃度以及其他參數，該等條件將被認為在投藥部位處或在作用部位處之組織或器官處對於個體而言處於正常範圍內。

[0056]

應理解，本發明及本文中所提供之態樣及實施例並不限於所揭示之特定實例，因此當然可能有變化。亦應理解，本文中所使用之技術僅是出於揭示特定實例及實施例之目的，且並不意欲為限制性的，此是由於本發明之範疇將僅由隨附申請專利範圍所限定。

[0057]

當提供值之範圍時，應理解，在該範圍之上限與下限之間的各中間值（除非上下文另外明確指示，否則為下限單位之十分之一）與該陳述範圍中之任何其他所陳述值或中間值均涵蓋在本發明內。此等較小範圍之上限及下限可獨立地包括在較小

範圍中，且亦涵蓋在本發明內，該陳述範圍中之任何特異性排除之極限除外。當所陳述範圍包括極限之一個或兩個時，排除彼等所包括之極限之一個或兩個之範圍亦包括在本發明中。

[0058]

除非另外定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域之一般技術者所通常理解相同之含義。儘管類似於或等效於本文中所描述之彼等的任何方法及材料亦可用於本發明之實踐或測試中，但現在描述較佳的方法及材料。本文中所提及之所有公開案均以引用之方式併入本文中，以揭示及描述與所引用之公開案相關之方法及/或材料。

[0059]

必須注意，除非上下文另外明確指示，否則如本文中所使用及在隨附申請專利範圍中，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個指示物。因此，例如，提及「嵌合抗原受體」包括熟習此項技術者已知之複數個此類嵌合抗原受體及其等效物等。應進一步注意，申請專利範圍可設計成排除任何視情況可選用之要素。因此，此陳述意欲充當使用與申請專利範圍要素之引用相關之如「單獨」、「僅」及類似者之此類排他性術語或使用「否定」限制的前提基礎。

[0060]

應理解，為清楚起見，在獨立實施例之上下文中描述之本發明之某些特徵亦可以組合方式提供於單個實施例中。相反地，為簡潔起見，在單個實施例之上下文中描述之本發明之各種特徵亦可單獨提供或以任何適合的子組合方式提供。屬於本發明之實施例之所有組合均特異性地包涵在本發明中，且正如各組合及每一組合單獨及清楚地揭示一樣揭示於本文中。另

外，各種實施例及其要素之所有子組合亦均特異性地包涵在本發明中，且正如各子組合及每一此類子組合單獨及清楚地揭示一樣揭示於本文中。

實施方式

[0061]

本文中所揭示態樣及實施例藉由在一個態樣中提供用於結合Ax1及/或Ror2 之條件活性嵌合抗原受體（CAR）來克服當前療法中之脫瘤效應問題。用於結合Ax1及/或Ror2 之CAR在腫瘤環境中具有活性，但在正常生理組織/器官中無活性。除了結合Ax1及/或Ror2 之CAR的各種實施例外，本文中提供了包括編碼本文中所提供之任何CAR的核苷酸序列之核酸實施例，以及用於表現CAR中任一者之病毒構築體，用該等病毒構築體中之至少一種感染之細胞，以及表現CAR之重組細胞。本發明之CAR可以各種方法使用，亦提供該等方法，用編碼本發明之CAR的表現載體（諸如重組病毒載體）感染T細胞及其他細胞毒性細胞之方法。

嵌合抗原受體

[0062]

本發明提供一種嵌合抗原受體，為簡單起見，其在本文中稱為「CAR」。在說明性實施例中，本發明之CAR與Ax1或Ror2結合，且在其他說明性實施例中，CAR以條件活性方式與Ax1或Ror2結合。在某些說明性實施例中，本文中所提供之CAR包括：
a) 至少一個條件活性抗原特異性靶向區（ASTR），其相比於pH為 7.4，在pH為 6.7 下呈現出增加的結合力；b) 跨膜域；及c) 胞內活化域。在說明性實施例中，CAR之抗原特異性靶向區為抗Ax1抗體或抗Ror2 抗體之條件活性scFv部分。此外，在說明性

實施例中，相比於正常生理環境中，ASTR在腫瘤環境或活體外腫瘤替代分析條件中呈現為活性增加。

[0063]

本發明之CAR可存在於真核細胞（例如，哺乳動物細胞）之質膜中，其中合適之哺乳動物細胞包括（但不限於）細胞毒性細胞、T淋巴球、幹細胞、幹細胞之子代、先驅細胞、先驅細胞之子代及NK細胞、NK-T細胞及巨噬細胞。當存在於真核細胞之質膜中時，本發明之CAR在結合ASTR的Axl及/或Ror2（在某些條件下）之存在下具有活性。Axl及Ror2為特異性結合對之第二成員。特異性結合對之Axl及/或Ror2可為可溶性（例如，未結合至細胞）因子；存在於諸如靶細胞之細胞之表面上的因子；存在於實體表面上之因子；存在於脂質雙層上之因子；以及類似者。當ASTR為抗體，且特異性結合對之第二成員為抗原時，抗原可為可溶性（例如，未結合至細胞）抗原；存在於諸如靶細胞之細胞之表面上的抗原；存在於實體表面上之抗原；存在於脂質雙層上之抗原；以及類似者。

[0064]

在一些情況下，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Axl及/或Ror2活化時，使細胞中之至少一個核酸之表現增加。舉例而言，在一些情況下，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Axl及/或Ror2活化時，與在Axl及/或Ror2不存在之情況下核酸之轉錄水準相比，使細胞中之至少一個核酸之表現增加至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約40%、至少約50%、至少約75%、至少約2倍、至少約2.5倍、至少約5倍、至少約10倍，或大於10倍。

[0065]

作為一實例，本發明之CAR可包括含有免疫受體酪胺酸基活化基元（ITAM）之胞內訊號傳導多肽；在此類情況下，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Axl及/或Ror2 活化時，使依賴經活化T細胞之核因子（NFAT）之轉錄增加。依賴NFAT之轉錄包括由NFAT家族（包括例如NFATc1、NFATc2、NFATc3、NFATc4、NFAT5）中之任何成員、AP-1、Sp1、NKKB及類似者誘導之轉錄。

[0066]

在一些情況下，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Axl或Ror2 活化時，可使由細胞產生之一或多種細胞介素增加。舉例而言，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Axl或Ror2 活化時，與在Axl及/或Ror2 不存在之情況下細胞所產生之細胞介素量相比，可使得細胞產生之細胞介素增加至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 75%、至少 2 倍、至少 2.5 倍、至少 5 倍、至少 10 倍，或大於 10 倍。在一些實施例中，本發明之CAR在存在於真核細胞之膜中時且由Axl及/或Ror2 活化時，與在Axl及/或Ror2 不存在之情況下細胞所分泌之細胞介素量相比，可使細胞分泌之細胞介素增加至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 75%、至少 2 倍、至少 2.5 倍、至少 5 倍、至少 10 倍，或大於 10 倍。其產量可增加之細胞介素包括（但不限於）干擾素 γ （IFN- γ ）、腫瘤壞死因子- α （TNF- α ）、IL-2、IL-15、IL-12、IL-4、IL-5、IL-10；趨化因子；生長因子；及類似者。

[0067]

在一些情況下，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Ax1及/或Ror2 活化時，可引起細胞中之核酸之轉錄增加，細胞介素產量增加及細胞分泌之細胞介素增加。

[0068]

在一些情況下，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Ax1及/或Ror2 活化時，產生細胞朝向靶細胞之細胞毒性活性，該靶細胞在其細胞表面上表現抗原，該抗原與CAR之第一多肽之抗原結合域結合。舉例而言，當真核細胞為細胞毒性細胞（例如，NK細胞或細胞毒性T淋巴球）時，本發明之CAR在存在於細胞之質膜中時且由Ax1及/或Ror2 活化時，使細胞朝向靶細胞之細胞毒性活性增加，該靶細胞在其細胞表面上表現Ax1及/或Ror2。舉例而言，當真核細胞為NK細胞或T淋巴球時，本發明之CAR在存在於細胞之質膜中時且由Ax1及/或Ror2 活化時，相比於在Ax1及/或Ror2 不存在之情況下的細胞之細胞毒性活性，使得細胞之細胞毒性活性增加至少約 10%、至少約 15%、至少約 20%、至少約 25%、至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 75%、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 5 倍、至少約 10 倍，或大於 10 倍。

[0069]

在一些情況下，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Ax1及/或Ror2 活化時，可產生與其他CAR活化相關之事件，諸如增殖及擴展（由於細胞分裂或抗凋亡反應增強）。

[0070]

在一些情況下，本發明之CAR在存在於真核細胞之質膜中時且由Ax1及/或Ror2 活化時，可產生與其他CAR活化相關之事件，諸如胞內訊號傳導調節、細胞分化或細胞死亡。

[0071]

本發明之CAR可存在於真核細胞膜中，其中CAR之第一多肽及第二多肽並未彼此共價連接。本發明之CAR可存在於真核細胞膜中作為單一異二聚體（heterodimer），該異二聚體未共價連接至膜中之任何其他多肽。替代地，本發明之第一CAR可存在於真核細胞膜中作為異二聚體，該異二聚體共價連接或非共價連接至本發明之第二CAR。在一些情況下，第一CAR及第二CAR經由二硫鍵共價連接，該二硫鍵形成在存在於鉸鏈區中之半胱胺酸之間，該鉸鏈區存在於第一CAR之第一多肽及第二CAR之第一多肽兩者中。

[0072]

在一些情況下，本發明之CAR可存在於真核細胞膜中，其中CAR之第一多肽包括抗體片段，且CAR之第二多肽包括衍生自細胞介素受體之訊號轉導域，使得在二聚合後，CAR可表示異二聚合訊號體（heterodimeric-signalobody）CAR，例如由至少兩種獨立多肽組成之訊號體。「訊號體」如在此項技術中已知，為由抗體片段及衍生自細胞介素受體之訊號轉導域組成的單個嵌合巨型分子。在某些情況下，本發明之異二聚合訊號體CAR在存在於真核細胞之細胞膜中，由二聚體二聚化，且由抗原（例如寡聚抗原）活化時，可誘導異二聚合訊號體CAR之寡聚合。異二聚合訊號體CAR之此配位體誘導之寡聚合可活化（例如增強）或保持（例如維持）訊號轉導，例如，異二聚合訊號體CAR之配位體誘導之寡聚合可傳輸誘發細胞反應之訊號。在一些情況下，可組合使用複數個異二聚合訊號體CAR以誘發所要的細胞反應。抗原特異性靶向區

[0073]

本發明之CAR包括特異性結合對之成員，其通常為ASTR。特異性結合對包括（但不限於）抗原-抗體結合對；配位體-受體結合對；及類似者。因此，適用於本發明之CAR中之特異性結合對之成員包括ASTR，該ASTR為抗體、抗原、配位體、配位體之受體結合域、受體、受體之配位體結合域及親和體。

[0074]

適用於本發明之CAR中之ASTR可為任何抗原結合多肽。在某些實施例中，ASTR為抗體，諸如全長抗體、單鏈抗體、Fab片段、Fab'片段、(Fab')₂片段、Fv片段及二價單鏈抗體或雙抗體。

[0075]

在一些實施例中，ASTR為單鏈Fv（scFv）。在一些實施例中，重鏈位於CAR中的輕鏈之N端。在其他實施例中，輕鏈位於CAR中的重鏈之N端。在所揭示之實施例中之任一者中，重鏈及輕鏈可由之連接子隔開，如本文中更詳細論述。在所揭示之實施例中之任一者中，重鏈或輕鏈可在CAR之N端且通常為另一域（諸如訊號序列或訊號肽）之C端。

[0076]

其他基於抗體之識別域（cAb VHH（駱駝抗體可變域）及人類化版本、IgNAR VH（鯊魚抗體可變域）及人類化版本、sdAb VH（單一域抗體可變域）及「駱駝化」抗體可變域適宜與CAR一起使用且適用於使用本發明之CAR的方法中。在一些情況下，亦適宜使用基於T細胞受體（TCR）之識別域，諸如單鏈TCR（scTv，含有V α V β 之單鏈兩域TCR）。

條件活性生物CAR（CAB-CAR）

[0077]

本發明之CAR通常是條件活性的。此特性通常為CAR之ASTR域之條件活性性質的結果。在說明性實施例中，本發明之CAB-CAR在腫瘤微環境中之條件下比在非腫瘤微環境中之條件下對Ax1或Ror2具有更高結合親和力。在一些實施例中，腫瘤微環境中之條件及非腫瘤微環境中之條件均為pH條件。因此，CAB-CAR可以條件活性方式選擇性地結合至Ax1或Ror2，通常是因為相比於pH為7.2至7.8（在正常生理環境中遇到的pH），其在pH為約6.0至6.8（在腫瘤微環境中遇到之pH）下具有對Ax1或Ror2更高的結合親和力。舉例而言，CAB-CAR在pH 7.4下可比在pH 6.7下具有對Ax1或Ror2更高的結合親和力。另外或替代地，CAB-CAR在pH 7.4下可比在pH 6.0下具有對Ax1或Ror2更高的結合親和力。此類條件可在活體外腫瘤替代分析中測試，該替代分析例如在活體內腫瘤環境中發現的一或多種條件下測試抗原結合及/或CAR活性（例如細胞裂解），如下文更詳細論述，該等條件與正常生理組織中之相應條件不同。舉例而言，相比於生理pH（7.2至7.8），活體外腫瘤替代分析條件可為低pH（例如6.0至6.8）。在說明性實例中，腫瘤替代分析條件為pH 6.7，而對應生理pH為7.4。

[0078]

在一些實施例中，CAB-CAR可藉由識別在生理條件（亦即親本，「野生型」或「wt」抗體）下識別之抗體之VH及/或VL獲得。抗體接著可突變及測試（進化）。熟練的業內人士可利用美國專利第8,709,755號中所揭示之用於識別條件活性抗體之方法來識別可用於本發明之CABCAR的ASTR中之其他條件活性抗體及抗體片段。互補決定區（CDR）是由VH及VL之相互作用形成之3維結構。為改變起點（「wt」抗體）之結合特異

性，期望使 VH/VL 中之一者或兩者突變可引起 CAB-CAR 中之 CAB 活性是合理的。為產生條件活性抗體，通常在生理條件下識別 VH 及 VL 二者，且接著使 VH 或 VL 或更典型地 VH 及 VL 二者突變且在非生理條件（諸如 pH 為 6.0 至 6.7 或腫瘤微環境之另一條件）下測試以產生條件活性抗體。

[0079]

編碼野生型抗體之 VH 及/或 VL 區之核酸可使用已知方法選殖。此類野生型 VH 及 VL 區之變體接著可藉由將修飾引入至編碼重鏈及輕鏈可變區之核苷酸序列中而製得。此類修飾包括例如抗體或抗體片段之胺基酸序列內的殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及置換之任何組合以達成條件活性抗體片段。

[0080]

在本文中之單獨章節中提供用於製備及/或分離條件活性 ASTR 之更具體的方法。

靶向 Axl 之條件活性 ASTR

[0081]

本文中所提供之各種態樣中之任一者之說明性實施例包括具有條件活性 ASTR 之 CAR，相比於在 pH 為 7.4，該條件活性 ASTR 在 pH 為 6.7 下與 Axl 蛋白特異性結合。在本文中之實例中提供此類 ASTR 及含有此類 ASTR 之 CAR 的實例。在某些實施例中，ASTR 結合至 Axl 之與包括 SEQ ID NO:79 之重鏈及 SEQ ID NO:80 之輕鏈的抗體相同的抗原決定位。在說明性實施例中，ASTR 結合至 Axl 之與包含 SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及 SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位。

[0082]

ASTR可為單鏈抗體、Fab片段、Fab'片段、(Fab')₂ 片段、Fv片段、二價單鏈抗體或雙抗體。在說明性實施例中，結合Ax1之條件活性ASTR為包含重鏈及輕鏈之單鏈可變片段。

[0083]

在ASTR與Ax1結合之一些實施例中，且在結合至Ax1之與包含SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包括三個互補決定區，該等互補決定區具有序列H1、序列H2 及序列H3，其中：

H1 序列是X₁GX₂TMN (SEQ ID NO:87) ；

H2 序列是LIKPSNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:88) ；及

H3 序列是GX₃YX₄SYX₅AMDY (SEQ ID NO:89)，其中X₁是T或W；X₂是H或A；X₃是H或D；X₄是E或H；及X₅是E或F。

[0084]

在ASTR與Ax1結合之一些實施例中，且在結合至包含Ax1之與SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位之說明性實施例（包括上文之重鏈實施例）中，ASTR可包括輕鏈可變區，該輕鏈可變區包括三個互補決定區，該等互補決定區具有序列L1、序列L2 及序列L3，其中：

L1 序列是KASQDVX6SAVA (SEQ ID NO:90) ；L2 序列是WX₇X₈TRX₉T (SEQ ID NO:91) ；及

其中X₆是S或V；X₇是A或Q；X₈是S或D；X₉是H或D；X₁₀是T或P；及X₁₁是T或R。

[0085]

在ASTR與Ax1結合之一些實施例中，且在結合至Ax1之與包

含SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包括三個互補決定區，該等互補決定區具有序列H1、序列H2 及序列H3，其中：

H1 序列是 $X_1GX_2X_3MX_4$ （SEQ ID NO:134）；H2 序列是 $LIKX_5SNGGTX_6YNQKFKG$ （SEQ ID NO:135）；及

H3 序列是 $GX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}DYX_{15}X_{16}$ （SEQ ID NO:136），

其中 X_1 是T、A或W； X_2 是H或A； X_3 是T或I； X_4 是N或I； X_5 是P或N； X_6 是S、I或T； X_7 是H、D、E、P、R或W； X_8 是Y或N； X_9 是E、A、D、F、G、H、I、L、M、N、R、V或Y； X_{10} 是S、D、M、N或Q； X_{11} 是Y、C、E或P； X_{12} 是F、E、N、S、T或V； X_{13} 是A、D、G、L或Y； X_{14} 是M、E或F； X_{15} 是W、A、D、H、L、N、P、R或T；及 X_{16} 是G或H。

[0086]

在ASTR與Ax1結合之一些實施例中，且在結合至Ax1之包含與SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位之說明性實施例（包括上文之重鏈實施例）中，ASTR可包括輕鏈可變區，該輕鏈可變區包括三個互補決定區，該等互補決定區具有序列L1、序列L2 及序列L3，其中：

L1 序列是 $KASQDX_{17}X_{18}SX_{19}VX_{20}$ （SEQ ID NO:137）；

L2 序列是 $X_{21}X_{22}X_{23}TRX_{24}T$ （SEQ ID NO:138）；及

L3 序列是 $QEX_{25}X_{26}SX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ （SEQ ID NO:139），

其中 X_{17} 是V、D、G、N或W； X_{18} 是S或V； X_{19} 是A、L或M； X_{20} 是A、D、N或Q； X_{21} 是W或F； X_{22} 是A、I、N、P或Q； X_{23}

是S或D；X₂₄是H或D；X₂₅是H、C、F、I、L、Q、S、T、V或Y；X₂₆是F、C、D、E、G、N或S；X₂₇是T、C或P；X₂₈是P、A、C、D、E、H、K、S、T、V或W；X₂₉是L、G或R；及X₃₀是T、I或R。

[0087]

在某些說明性實施例中，ASTR包括SEQ ID NO:80 之輕鏈可變區及/或SEQ ID NO:79 之重鏈可變區。此等說明性實施例可包括輕鏈之重鏈N端或重鏈之輕鏈N端。在說明性實施例中，抗Ax1 ASTR可包括SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:129、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160 或SEQ ID NO:161 中之任一者之序列。

[0088]

此等抗Ax1實施例中之任一者之重鏈及輕鏈包括兩個可變區，該等可變區通常由連接子分離開。連接子長度可在 6 個與 100 個胺基酸之間。在一些實施例中，連接子為連接子 1（SEQ ID NO:53）、連接子 2（SEQ ID NO:54）或連接子 3（SEQ ID NO:55）。在說明性實施例中，該兩個可變區為重鏈可變區及輕鏈可變區。重鏈或輕鏈可位於ASTR上之N端至另一端。在某些說明性實施例中，重鏈位於輕鏈之N端。

[0089]

相比於pH 7.4，在pH 6.7 下對Ax1具有增加的結合力之例示性條件性活性CAR（CAB-CAR）見於本文中之實例 1 中。在說明性實施例中，CAR或ASTR可結合至Ax1之與包含SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位。在此類說明性實施例之其他實施例中，抗Ax1 CAR或ASTR包含或為單鏈可變片段（scFv）。在其他說明性實施例中，抗Ax1 scFv包含重鏈（其為輕鏈之N端）或輕鏈（其為

重鏈之N端)。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，且在結合至Ax1之與包括SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:129、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160 或SEQ ID NO:161 中之任一者。此外，本文中之實施例中之任一者的抗Ax1 CAR可包括本文中所提供之CAR組分中之任一者。在某些例示性實施例中，抗Ax1 CAR可包括表 1 中所列舉之CAR組分且可為表 1 中之CAR中之任一者。更典型地，對於本文中包括抗Ax1 CAR之任何實施例，CAR為CAB-CAR，且在非限制性說明性實施例中可包括（例如）表 1 中所提供之展現細胞毒性活性之CAR-CAR組分及CAB-CAR中之任一者。舉例而言，抗Ax1 CAB-CAR可包括CD8 單肽、CD8 或CD28 柄/跨膜域、CD137、ICΔ，或ICΔ共刺激域及CD137 共刺激域兩者，及/或CD3Z活化域。此外，本文中包括抗Ax1 CAR（且尤其是抗Ax1 CAB-CAR）的實施例中之任一者之說明性CAR在非限制性說明性實施例中包括表 1 中展現條件細胞毒性活性之抗Ax1 CAB-CAR中之任一者。此類說明性CAB-CAR包括表 1 中之F1-2-1、F1-2-2、F1-2-3、F1-2-6、F1-2-8、F1-2-10、F1-2-13、F1-2-14、F1-2-15、F1-2-22 或F1-2-23。在本文中包括ASTR之實施例中之任一者中，ASTR可包括F1-2-1、F1-2-2、F1-2-3、F1-2-6、F1-2-8、F1-2-10、F1-2-13、F1-2-14、F1-2-15、F1-2-22 或F1-2-23 之ASTR.此外，本文中包括抗Ax1 CAR（且尤其是抗Ax1 CAB-CAR）的實施例中之任一者之說明性CAR在非限制性說明性實施例中包括表 1 中展現高條件細胞毒性活性之抗Ax1 CAB-CAR中之任一者。此類說明性CAB-CAR包括F1-2-13、F1-2-15、F1-2-22 或F1-2-23。相應地，在本文中包括ASTR之實

施例中之任一者中，ASTR可包括F1-2-1、F1-2-2、F1-2-3、F1-2-6、F1-2-8、F1-2-10、F1-2-13、F1-2-14、F1-2-15、F1-2-22或F1-2-23之ASTR。

[0090]

本文中所揭示之重鏈可變區多肽及輕鏈可變區多肽是使用美國專利第 8,709,755 號中所揭示之方法由親本抗體重鏈可變區（SEQ ID NO:93）及親本抗體輕鏈可變區（SEQ ID NO:94）識別出。熟練的業內人士可利用美國專利第 8,709,755 號中所揭示之用於識別條件活性抗體之方法來識別可用於本發明之CAB-CAR的ASTR中之額外條件活性抗體及抗體片段。

[0091]

在一些實施例中，重鏈可變區可為SEQ ID NO:112-114。在一些實施例中，輕鏈可變區可為SEQ ID NO:108-111。此等重鏈及輕鏈可變區可特異性結合至Axl。已發現包含此等重鏈及輕鏈可變區中之任一者之抗體在pH 6.7下比在pH 7.4下對Axl具有更高的結合親和力。pH 6.7是在腫瘤微環境中發現之pH。pH 7.4是在非腫瘤、正常生理微環境中發現的pH。

[0092]

CAR亦可包括SEQ ID NO:108-114 序列之重鏈及輕鏈可變區之變體，該等變體可特異性結合至Axl。為衍生此等變體，判定重鏈可變區（H1-H3）之互補決定區（CDR）及輕鏈可變區（L1-L3）之CDR應保持完整。此等重鏈及輕鏈可變區之變體可藉由將適當的修飾引入至編碼重鏈及輕鏈可變區之核苷酸序列中，或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如抗體或抗體片段之胺基酸序列內的殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代中之任何組合以得到最終構築體，其條件是該

最終構築體具有所要特性中之至少一者，例如抗原結合。

靶向Ror2 之條件活性ASTR

[0093]

本文中所提供之各種態樣中之任一者之說明性實施例包括具有條件活性ASTR之CAR，相比於pH為 7.4，該條件活性ASTR在pH為 6.7 下與Ror2 蛋白特異性結合。在本文中之實例中提供此類ASTR及含有此類ASTR之CAR的實例。在某些實施例中，ASTR結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之重鏈的抗體相同的抗原決定位，或ASTR結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:151 之重鏈的抗體相同的抗原決定位。在說明性實施例中，ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位，或ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位。在說明性實施例中，ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位，或ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位結合。

[0094]

ASTR可為單鏈抗體、Fab片段、Fab'片段、(Fab')₂ 片段、Fv片段、二價單鏈抗體或雙抗體。在說明性實施例中，結合Ror2 之條件活性ASTR為包含重鏈及輕鏈之單鏈可變片段。

[0095]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，ASTR可包括具有三個互補決定區之重鏈可變區，該等互補決定區具有H1 序列、H2

序列及H3 序列，其中：

H1 序列是 GYTX₁TEX₂TX₃H (SEQ ID NO:95) 或 X₄GYSITTGYWYWN (SEQ ID NO:96) ；

H2 序列是GX₅NX₆NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97) 或 YITYDGSKNYPNPSLKN (SEQ ID NO:98) ；及

H3 序列是 GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID NO:99) 或 FEGVWX₇GLDY (SEQ ID NO:100) ；

其中X₁ 是F或E；X₂ 是Y或D；X₃ 是M或D；X₄ 是T或S；X₅ 是E或I；X₆ 是T或D；及X₇ 是Y或G。

[0096]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，且在結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括具有三個互補決定區之重鏈可變區，該等互補決定區具有序列H1、序列H2 及序列H3，其中：

H1 序列是GYTX₁TEX₂TX₃H (SEQ ID NO:95) ；

H2 序列是GX₅NX₆NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97) ；
及

H3 序列是GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID NO:99) ；

其中X₁ 是F或E；X₂ 是Y或D；X₃ 是M或D；X₅ 是E或I；及X₆ 是T或D。

[0097]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，且在結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括具有三個互補決定區之重鏈可變區，該等互補

決定區具有序列H1、序列H2 及序列H3，其中：

H1 序列是X₄GYSITTGYWYWN（SEQ ID NO:96）；

H2 序列是YITYDGSKNYNPSLKN（SEQ ID NO:98）；及

H3 序列是FEGVWX₇GLDY（SEQ ID NO:100）；

其中X₄是T或S；及X₇是Y或G。

[0098]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，包括但不限於具有上述序列H1、序列H2 及序列H3 之重鏈之彼等實施例，ASTR包括輕鏈可變區，該輕鏈可變區包括互補決定區，該等互補決定區具有序列L1、序列L2 及序列L3，其中：

L1 序列是 SATSSX₈SYMH（SEQ ID NO:101）或 RASESVDRYGNSFIH（SEQ ID NO:102）；

L2 序列是X₉TSNLAS（SEQ ID NO:103）或RTYNLES（SEQ ID NO:104）；及

L3 序列是QQRSSYPFT（SEQ ID NO:105）或QQTNEDPWT（SEQ ID NO:106）；

其中X₈是E或V；及X₉是G或H。

[0099]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，且在結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括具有三個互補決定區之輕鏈可變區，該等互補決定區具有序列L1、序列L2 及序列L3，其中：

L1 序列是SATSSX₈SYMH（SEQ ID NO:101）；

L2 序列是X₉TSNLAS（SEQ ID NO:103）；及

L3 序列是QQRSSYPFT（SEQ ID NO:105）；

其中X₈ 是E或V；及X₉ 是G或H。

[0100]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，且在結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括具有三個互補決定區之輕鏈可變區，該等互補決定區具有序列L1、序列L2 及序列L3，其中：

L1 序列是RASESVDRYGNSFIH (SEQ ID NO:102) ；

L2 序列是RTYNLES (SEQ ID NO:104) ；及

L3 序列是QQTNEDPWT (SEQ ID NO:106) 。

[0101]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，ASTR可包括重鏈可變區，其包括三個互補決定區，該等互補決定區具有H1 序列、H2 序列及H3 序列，其中：

H1 序列是GYTX₁TEX₂X₃X₄H (SEQ ID NO:140) 或GYSITTGX₂₉YWN (SEQ ID NO:141) ；

H2 序列是X₅X₆X₇X₈NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:142) 或YITYDGSX₃₀NYNPSLKN (SEQ ID NO:143) ；及

H3 序列是X₉X₁₀X₁₁SX₁₂YX₁₃YX₁₄X₁₅SYFX₁₆X₁₇X₁₈(SEQ ID NO:144) 或CSX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄VX₃₅X₃₆X₃₇LDX₃₈ (SEQ ID NO:145) ；

其中X₁ 是F或E；X₂ 是Y或D；X₃ 是T或C；X₄ 是M、D、E或Y；X₅ 是G或S；X₆ 是I或E；X₇ 是N、C、L或V；X₈ 是T、D或E；X₉ 是A、M或T；X₁₀ 是R或H；X₁₁ 是G或E；X₁₂ 是L或F；X₁₃ 是S或G；X₁₄ 是G或D；X₁₅ 是N或E；X₁₆ 是D或L；X₁₇ 是Y、C或T；X₁₈ 是W或L；X₂₉ 是Y、E、R或T；X₃₀ 是K或N；X₃₁ 是R、

G、H、W或Y； X_{32} 是F、C、N,或Q； X_{33} 是E或S； X_{34} 是G、E、F、H、M、Q或S； X_{35} 是W、A、I、P、Q、T或V； X_{36} 是Y、G、N或Q； X_{37} 是G、S或T；及 X_{38} 是Y或I。

[0102]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，且在結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括重鏈可變區，其包括三個互補決定區，該等互補決定區具有序列H1、序列H2 及序列H3，其中：

H1 序列是GYTX₁TEX₂X₃X₄H（SEQ ID NO:140）；

H2 序 列 是 X₅X₆X₇X₈NNGGTGYNQKFKG（SEQ ID NO:142）；及

H3 序列是X₉X₁₀X₁₁SX₁₂YX₁₃YX₁₄X₁₅SYFX₁₆X₁₇X₁₈(SEQ ID NO:144)；

其中X₁ 是F或E；X₂ 是Y或D；X₃ 是T或C；X₄ 是M、D、E或Y；X₅ 是G或S；X₆ 是I或E；X₇ 是N、C、L或V；X₈ 是T、D或E；X₉ 是A、M或T；X₁₀ 是R或H；X₁₁ 是G或E；X₁₂ 是L或F；X₁₃ 是S或G；X₁₄ 是G或D；X₁₅ 是N或E；X₁₆ 是D或L；X₁₇ 是Y、C或T；及X₁₈ 是W或L。

[0103]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，且在結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括重鏈可變區，其包括三個互補決定區，該等互補決定區具有序列H1、序列H2 及序列H3，其中：

H1 序列是GYSITTGX₂₉YWN（SEQ ID NO:141）；

H2 序列是 YITYDGSX₃₀NYNPSLKN (SEQ ID NO:143) ;
及

H3 序列是 CSX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄VX₃₅X₃₆X₃₇LDX₃₈ (SEQ ID NO:145) ;

其中 X₂₉ 是 Y、E、R 或 T ; X₃₀ 是 K 或 N ; X₃₁ 是 R、G、H、W 或 Y ; X₃₂ 是 F、C、N 或 Q ; X₃₃ 是 E 或 S ; X₃₄ 是 G、E、F、H、M、Q 或 S ; X₃₅ 是 W、A、I、P、Q、T 或 V ; X₃₆ 是 Y、G、N 或 Q ; X₃₇ 是 G、S 或 T ; 及 X₃₈ 是 Y 或 I。

[0104]

在 ASTR 與 Ror2 結合之一些實施例中，ASTR 可包括輕鏈可變區，其包括三個互補決定區，該等互補決定區具有 L1 序列、L2 序列及 L3 序列，其中：

L1 序列是 SATSSX₁₉X₂₀X₂₁MX₂₂ (SEQ ID NO:146) 或 RASESVDRYGNSX₃₉IH (SEQ ID NO:147) ;

L2 序列是 X₂₃TSNLAS (SEQ ID NO:148) 或 X₄₀TYX₄₁LES (SEQ ID NO:149) ; 及

L3 序列是 QX₂₄X₂₅SX₂₆YPFX₂₇X₂₈ (SEQ ID NO:150) 或 QQX₄₂NX₄₃DPX₄₄TX₄₅ (SEQ ID NO:85) ;

其中 X₁₉ 是 V 或 E ; X₂₀ 是 S 或 D ; X₂₁ 是 Y、C 或 D ; X₂₂ 是 H、G 或 L ; X₂₃ 是 G、C、H 或 P ; X₂₄ 是 Q 或 E ; X₂₅ 是 R 或 H ; X₂₆ 是 S、D、G、I、Q 或 V ; X₂₇ 是 T 或 D ; X₂₈ 是 F、D 或 E ; X₃₉ 是 F、S 或 T ; X₄₀ 是 R、C、D、E 或 W ; X₄₁ 是 N 或 D ; X₄₂ 是 T、I 或 P ; X₄₃ 是 E 或 V ; X₄₄ 是 W 或 T ; 及 X₄₅ 是 F 或 T。

[0105]

在 ASTR 與 Ror2 結合之一些實施例中，且在結合至 Ror2 之與包括 SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及 SEQ ID NO:152 之抗體輕

鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括輕鏈可變區，其包括三個互補決定區，該等互補決定區具有序列L1、序列L2及序列L3，其中：

L1 序列是SATSSX₁₉X₂₀X₂₁MX₂₂（SEQ ID NO:146）；

L2 序列是X₂₃TSNLAS（SEQ ID NO:148）；及

L3 序列是QX₂₄X₂₅SX₂₆YPFX₂₇X₂₈（SEQ ID NO:150）；

其中X₁₉是V或E；X₂₀是S或D；X₂₁是Y、C或D；X₂₂是H、G或L；X₂₃是G、C、H或P；X₂₄是Q或E；X₂₅是R或H；X₂₆是S、D、G、I、Q或V；X₂₇是T或D；及X₂₈是F、D或E。

[0106]

在ASTR與Ror2 結合之一些實施例中，且在結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括輕鏈可變區，其包括三個互補決定區，該等互補決定區具有序列L1、序列L2及序列L3，其中：

L1 序列是RASESVDRYGNSX₃₉IH（SEQ ID NO:147）；

L2 序列是X₄₀TYX₄₁LES（SEQ ID NO:149）；及

L3 序列是QQX₄₂NX₄₃DPX₄₄TX₄₅（SEQ ID NO:85）；

其中X₃₉是F、S或T；X₄₀是R、C、D、E或W；X₄₁是N或D；X₄₂是T、I或P；X₄₃是E或V；X₄₄是W或T；及X₄₅是F或T。

[0107]

在一些實施例中，結合Ror2 之條件活性ASTR，且在結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位之條件活性ASTR的說明性實施例中，包括具有選自SEQ ID NO:115-119 及SEQ ID NO:151 之胺基酸序列的重鏈可變區。在條件活性ASTR結合至Ror2 之與

包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈的抗體（視情況包括前文句子中所列舉之重鏈）相同的抗原決定位的此等說明性實施例中，輕鏈可包括SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:122-124 或SEQ ID NO:152 之輕鏈。

[0108]

在某些說明性實施例中，條件活性ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈的抗體及包含SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的抗體相同的抗原決定位，且包括SEQ ID NO:120-121 及SEQ ID NO:82-83 中之任一者之抗體重鏈可變區。在條件活性ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈的抗體及包含SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的抗體（視情況包括前文句子中所列舉之重鏈）相同的抗原決定位的此等說明性實施例中，輕鏈可包括SEQ ID NO:84 或SEQ ID NO:86 之輕鏈。

[0109]

相比於pH 7.4，在pH 6.7 下具有與Ror2 增加的結合力之例示性條件活性CAR（CAB-CAR）見於本文中之實例 1 中。在說明性實施例中，CAR或ASTR可結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位，或CAR或ASTR可結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位。在此類說明性實施例之其他實施例中，抗Ror2 CAR或ASTR包含或為單鏈可變片段（scFv），且在其他說明性實施例中，包含輕鏈（其為重鏈之N端）或包含重鏈（其為輕鏈之N端）。在本文中包括CAR或ASTR之實施例中之任一者中，且在結合至Ror2 之與包含

SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位，或結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括SEQ ID NO:130-132 或SEQ ID NO:153-158 中之任一者。此外，本文中之實施例中之任一者的抗Ror2 CAR可包括本文中所提供之CAR組分中之任一者。在某些例示性實施例中，抗Ror2 CAR可包括表 2 中所列舉之CAR組分且可為表 2 中之CAR中之任一者。更典型地，對於本文中包括抗Ror2 CAR之任何實施例，CAR為CAB-CAR，且在非限制性說明性實施例中可包括例如CAR-CAR組分中之任一者及表 2 中所提供之展現細胞毒性活性的CAB-CAR。舉例而言，抗Ror2 CAB-CAR可包括CD8 訊號肽、CD8 或CD28 柄/跨膜域、CD137 共刺激域及/或CD3Z活化域。此外，本文中包括抗Ror2 CAR（且尤其是抗Ror2 CAB-CAR）的實施例中之任一者之說明性CAR在非限制性說明性實施例中包括表 2 中展現條件細胞毒性活性之抗Ror2 CAB-CAR中之任一者。此類說明性CAB-CAR包括F1-1-9、F1-1-10、F1-1-11、F1-1-12、F1-1-15、F1-1-17、F1-1-18、F1-1-19、F1-1-20、F1-1-21、F1-1-23、F1-1-25 或F1-1-26。在本文中包括抗Ror2 ASTR之實施例中之任一者中，ASTR可包括表 2 中之F1-1-9、F1-1-10、F1-1-11、F1-1-12、F1-1-15、F1-1-17、F1-1-18、F1-1-19、F1-1-20、F1-1-21、F1-1-23、F1-1-25 或F1-1-26 之ASTR。此外，本文中包括抗Ror2 CAR（且尤其地抗Ror2 CAB-CAR）的實施例中之任一者之說明性CAR在非限制性說明性實施例中包括表 2 中展現高條件細胞毒性活性之抗Ror2 CAB-CAR中之任一者。此類說明性CAB-CAR包括F1-1-11、F1-1-12、F1-1-15、

F1-1-17、F1-1-19、F1-1-20 或 F1-1-23。相應地，在本文中包括抗 Ror2 ASTR 之實施例中之任一者中，ASTR 可包括 F1-1-11、F1-1-12、F1-1-15、F1-1-17、F1-1-19、F1-1-20、F1-1-23 之 ASTR。

[0110]

更具體而言，關於本文中所提供之實施例中之任一者，無論是否針對 Axl 或 Ror2，ASTR 可為單鏈抗體、Fab 片段、Fab' 片段、(Fab')₂ 片段、Fv 片段、二價單鏈抗體或雙抗體。在說明性實施例中，結合 Ror2 之條件活性 ASTR 為包含重鏈及輕鏈之單鏈可變片段。

[0111]

本文中所揭示之重鏈可變區多肽及輕鏈可變區多肽經由美國專利第 8,709,755 號中所揭示之方法由親本抗體識別出。熟練的業內人士可利用美國專利第 8,709,755 號中所揭示之用於識別條件活性抗體之方法來識別可用於本發明之 CAB-CAR 的 ASTR 中之額外條件活性抗體及抗體片段。

[0112]

一些例示性 ASTR 之重鏈可變區之胺基酸序列示於 SEQ ID NO:115-121 中。此等例示性 ASTR 之輕鏈可變區之胺基酸序列示於 SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:86 及 SEQ ID NO:122-124 中。此等重鏈可變區及輕鏈可變區可特異性結合至人類 Ror2。已發現包括此等重鏈可變區及輕鏈可變區中之任一者之抗體及抗體片段在腫瘤微環境中之 pH 下比在非腫瘤微環境中或生理條件中之 pH 下對 Ror2 具有更高的結合親和力。舉例而言，抗體及抗體片段在 pH 6.0 下比在 pH 7.4 下對 Ror2 具有更高的結合親和力。在一些實施例中，抗體及抗體片段在 pH 6.7 下比在 pH 7.4 下對 Ror2 具有更高的結合親和力。

[0113]

抗Ror2 抗體及抗體片段在腫瘤中對Ror2 之結合親和力與其在正常組織中對Ror2 之結合親和力相比更高。此等抗Ror2 抗體或抗體片段被認為與此項技術中已知的單株抗Ror2 抗體相比具有較長的半衰期及減少的副作用以及可比的功效。此等特徵允許使用較高劑量之此等抗Ror2 抗體或抗體片段，以便將其傳遞至患者，由此成為更有效的治療選擇。

[0114]

儘管ASTR可包括具有SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:86 及SEQ ID NO:115-124 之胺基酸序列之重鏈可變區及輕鏈可變區，本發明亦提供可其與人類Ror2 特異性結合之變體。為衍生此等變體，重鏈可變區（H1-H3）之互補決定區（CDR）及輕鏈可變區（L1-L3）之互補決定區應保持完整。然而，互補決定區外之重鏈可變區及輕鏈可變區中之胺基酸序列可根據取代、插入及缺失原則進行突變。重鏈可變區及輕鏈可變區之變體可藉由將適當的修飾引入至編碼重鏈可變區及輕鏈可變區之核苷酸序列中，或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如重鏈可變區及輕鏈可變區中之胺基酸序列內的殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代中之任何組合以得到CAR之ASTR，其條件是其具有所要特性，例如針對人類Ror2 之條件抗原結合。

多特異性ASTR

[0115]

在一些實施例中，ASTR可為多特異性的，例如雙特異性抗體。多特異性抗體對至少兩個不同的位點及目標具有結合特異性。在某些實施例中，結合特異性中之一者是針對Axl或Ror2，

且另一者是針對另一抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合至Ax1或Ror2之兩個不同的抗原決定位。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒劑定位於表現Ax1或Ror2之細胞中。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段。在某些實施例中，結合特異性中之一者結合至Ax1，且另一者結合至Ror2，其中兩者均不具有條件活性，一者或兩者均具有條件活性。

[0116]

適用於本發明之CAR中之ASTR可具有多種抗原結合特異性。在說明性實施例中，ASTR與已知在某些癌細胞（亦即癌症特異性抗原）上表現的Ax1或Ror2結合。在一些情況下，ASTR是雙特異性的，且除了通常以條件活性方式結合Ax1或Ror2之抗原結合域外，ASTR可包括特異於第二抗原之第二抗原結合域，該第二抗原由癌細胞（例如癌細胞相關之抗原）表現（合成）。癌細胞相關之抗原可為與以下相關聯之抗原：例如乳癌細胞、B細胞淋巴瘤、霍奇金（Hodgkin）淋巴瘤細胞、卵巢癌細胞、前列腺癌細胞、間皮瘤、肺癌細胞（例如，小細胞肺癌細胞）、非霍奇金B細胞淋巴瘤（B-NHL）細胞、卵巢癌細胞、前列腺癌細胞、間皮瘤細胞、肺癌細胞（例如，小細胞肺癌細胞）、黑色素瘤細胞、慢性淋巴細胞白血病細胞、急性淋巴細胞白血病細胞、神經母細胞瘤細胞、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、神經管胚細胞瘤、結腸癌細胞等。癌細胞相關之抗原亦可由非癌細胞表現。

[0117]

可與CAR之雙特異性ASTR結合之抗原的非限制性實例除了Ax1或Ror2，包括例如CD19、CD20、CD38、CD30、ERBB2、CA125、MUC-1、前列腺特異性膜抗原（PSMA）、CD44表面

黏著分子、間皮素、癌胚抗原（CEA）、表皮生長因子受體（EGFR）、EGFR_{vIII}、血管內皮生長因子受體-2（VEGFR2）、高分子量黑素瘤相關之抗原（HMW-MAA）、MAGE-A1、IL-13R-a2、GD2 及類似者。

[0118]

在一些情況下，適用於CAR之個體雙特異性ASTR的特異性結合對中之成員除了結合Axl或Ror2之特異性結合對成員外，還有結合受體之配位體之特異性結合對成員。配位體包括（但不限於）：細胞介素（例如，IL-13等）；生長因子（例如，調節蛋白、血管內皮生長因子（VEGF）及類似者）；整合素結合肽（例如包含序列Arg-Gly-Asp之肽）；及類似者。

[0119]

當個體雙特異性CAR中之特異性結合對之成員為配位體時，CAR可在特異性結合對之第二成員之存在下活化，其中特異性結合對之第二成員為該配位體之受體。舉例而言，當配位體為VEGF時，特異性結合對之第二成員可為包括可溶性VEGF受體之VEGF受體。

[0120]

如上文所提及，在一些情況下，包括於個體雙特異性CAR中之特異性結合對之成員為ASTR，該ASTR為受體，例如配位體之受體、共受體等。該受體可為受體之配位體結合片段。合適受體包括（但不限於）：生長因子受體（例如，VEGF受體）；殺手細胞凝集素樣受體子家族K；成員1（NKG2D）多肽（MICA、MICB及ULB6之受體）；細胞介素受體（例如，IL-13受體；IL-2受體等）；CD27；自然細胞毒性受體（NCR）（例如，NKP30（NCR3/CD337）多肽（HLA-B相關之轉錄物3（BAT3）及B7-H6

之受體）等）；等等。

柄區

[0121]

在一些情況下，CAR包括鉸鏈域（本文中亦稱為「間隔」或「柄」），該鉸鏈域位於細胞外之CAR部分中且插入在ASTR與跨膜域之間。在說明性實施例中，鉸鏈域為CD8 柄域或CD28 柄域。在一些情況下，該柄域與野生型CD8 柄區（
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFA（SEQ ID NO:125））具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性，與野生型CD28 柄區（
FCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP
（SEQ ID NO:126））具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性，或與野生型免疫球蛋白重鏈鉸鏈/柄區具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致性。在一些情況下，柄域是衍生自受體之鉸鏈區多肽（例如，CDS衍生之鉸鏈區）。在CAR中，所採用之柄允許條件活性抗原特異性靶向區（且通常是整個CAR）在相對於對應生理條件之活體外腫瘤替代分析條件下保持其對Ror2 或Axl特性之增加的結合力。

[0122]

柄區長度可為約 4 個胺基酸至約 50 個胺基酸，例如約 4 aa至約 10 aa、約 10 aa至約 15 aa、約 15 aa至約 20 aa、約 20 aa至約 25 aa、約 25 aa至約 30 aa、約 30 aa至約 40 aa，或約 40 aa至約 50 aa。

[0123]

在一些情況下，個體CAR之鉸鏈區包括至少一個半胱胺

酸。舉例而言，在一些情況下，鉸鏈區可包括序列 Cys-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO:62)。若存在，則第一CAR之鉸鏈區中之半胱胺酸可用於與第二CAR中之鉸鏈區形成二硫鍵。

[0124]

免疫球蛋白鉸鏈/柄區胺基酸序列在此項技術中已知；參見例如Tan等人，(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:162；及Huck等人，(1986) *Nucl. Acids Res.* 14:1779。作為非限制性實例，免疫球蛋白鉸鏈區可包括與以下胺基酸序列中之任一者之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 序列一致性的域：DKTHT (SEQ ID NO:63)；CPPC (SEQ ID NO:62)；CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO:64) (參見例如 Glaser等人(2005) *J. Biol. Chem.* 280:41494)；ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:65)；KSCDKTHTCP (SEQ ID NO:66)；KCCVDCP (SEQ ID NO:67)；KYGPPCP (SEQ ID NO:68)；EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:69) (人類IgG1鉸鏈)；ERKCCVECPCPPCP (SEQ ID NO:70) (人類IgG2 鉸鏈)；ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO:71) (人類IgG3 鉸鏈)；SPNMVPHAHHAQ (SEQ ID NO:72) (人類IgG4 鉸鏈)；及類似者。鉸鏈區可包括人類IgG1、IgG2、IgG3 或IgG4 鉸鏈區之胺基酸序列。相比於野生型(天然存在之)鉸鏈區，該鉸鏈區可包括一或多個胺基酸取代及/或插入及/或缺失。舉例而言，人類IgG 1 鉸鏈之His229 可經Tyr取代，使得鉸鏈區包括序列EPKSCDKTYTCPPCP；參見例如Yan等人(2012) *J. Biol. Chem.* 287:5891。鉸鏈區可包括衍生自人類CD8 之胺基酸序列；例如，該鉸鏈區可包括胺基酸序列：

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
D (SEQ ID NO:73) 或其變體。

跨膜域

[0125]

本發明之CAR包括用於插入至真核細胞膜中之跨膜域。跨膜域可插入在ASTR與共刺激域之間。跨膜域可插入在鉸鏈區與共刺激域之間，使得嵌合抗原受體自胺基端（N端）至羧基端（C端）依次包括：ASTR、鉸鏈區、跨膜域及活化域。

[0126]

提供將多肽插入至真核生物（例如，哺乳動物）細胞之細胞膜中的任何跨膜（TM）域適用於本文中所揭示之態樣及實施例中。在本文中所提供之某些實施例中，本文中所提供之包括CAR的任何態樣之TM域為C* α TM域、CD8 TM域、CD4 TM域、C3Z TM域、C28 TM域、C134 TM域、CD7 TM域、CD8 TM域或CD28 TM域。本文中所提供之CAR之說明性實施例包括CD8 TM域或CD28 TM域。適用於本文中所提供之態樣或實施例中之任一者的TM域之其他非限制性實例包括與以下TM域中之任一者之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：

a) CD8 α (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:46)) ；

b) CD8 β (LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (SEQ ID NO:47)) ；

c) CD4 (ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC (SEQ ID NO:48)) ；

d) CD3Z (LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (SEQ ID NO:49)) ；

e) CD28 (FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:50)) ；

f) CD134 (OX40) : (VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL (SEQ ID NO:51)) ；

g) CD7 (ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (SEQ ID NO:52)) ；

h) CD8 α 柄 及 TM (TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:75)) ，及
i) CD28 柄 及 TM (IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:76)) 。

[0127]

作為非限制性實例，本發明之一態樣之跨膜域可與以下具有至少 80%、90%或 95%序列一致性：SEQ ID NO:46 跨膜域、CD8 β 跨膜域、CD4 跨膜域、CD3 ζ 跨膜域、CD28 跨膜域、CD134 跨膜域、或CD7 跨膜域。

CAR連接子

[0128]

在一些情況下，CAR可包括在任何兩個相鄰域之間的連接子。舉例而言，連接子可在跨膜域與第一刺激域之間。作為另一實例，ASTR可為抗體，且連接子可在重鏈與輕鏈之間。作為另一實例，連接子可在ASTR與跨膜域及共刺激域之間。作為另一實例，連接子可在第二多肽之共刺激域與胞內活化域之間。

[0129]

連接肽可具有多種胺基酸序列中之任一者。蛋白質可藉由通常具有可撓性性質之間隔肽連接，但不排除其他化學鍵。連接子可為長度在約 1 個與約 100 個胺基酸之間，或長度在約 1 個與約 25 個胺基酸之間的肽。此等連接子可藉由使用合成的編碼連接子之寡核苷酸偶合該等蛋白質來產生。可使用具有一定程度之可撓性之肽連接子。連接肽實際上可具有任何胺基酸序列，考慮到合適之連接子將具有產生通常可撓性肽的序列。較小胺基酸（諸如甘胺酸及丙胺酸）之用途為用於創建可撓性肽。此類序列之創建對於熟習此項技術者而言為常規的。

[0130]

合適之連接子可易於選擇且可為合適之不同長度中之任一者，諸如 1 個胺基酸（例如 Gly）至 20 個胺基酸、2 個胺基酸至 15 個胺基酸、3 個胺基酸至 12 個胺基酸，包括 4 個胺基酸至 10 個胺基酸、5 個胺基酸至 9 個胺基酸、6 個胺基酸至 8 個胺基酸、或 7 個胺基酸至 8 個胺基酸，且可為 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個或 7 個胺基酸。

[0131]

例示性可撓性連接子包括甘胺酸聚合物 $(G)_n$ 、甘胺酸-絲胺酸聚合物（包括例如 $(GS)_n$ 、 $GSGGS_n$ 、 $GGGS_n$ 及 $GGGGS_n$ ，其中 n 為至少一之整數），甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物及此項技術中已知之其他可撓性連接子。甘胺酸及甘胺酸-絲胺酸聚合物是令人感興趣的，此是因為此等胺基酸之兩者均為相對非結構化的，且因此可作為組分之間的中性鏈。甘胺酸聚合物尤其令人感興趣，此是因為甘胺酸比甚至丙胺酸具有明顯更多的 ϕ - ψ 空間，且比具有較長側鏈之殘基受到更少限制

(參見 Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)) 。
例示性可撓性連接子包括 (但不限於) GGGGSGGGGSGGGGS
(SEQ ID NO:53) 、
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID
NO:54) 、GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55) 、GGSG (SEQ
ID NO:56) 、GGSGG (SEQ ID NO:57) 、 GSGSG (SEQ
ID NO:58) 、GSGGG (SEQ ID NO:59) 、GGGSG (SEQ ID NO:60) 、
GSSSG (SEQ ID NO:61) 及類似者。一般熟練技術人員將認識
到，將肽結合至上文所描述之任何元件之設計可包括為完全或
部分可撓性的連接子，使得連接子可包括可撓性連接子以及賦
予較低可撓性結構之一或多個部分。

調節域

[0132]

調節域可改變CAR中之活化域之作用，包括增強或抑制活
化域之下游作用或改變反應之性質。適用於本發明之CAR中且
包括於本文中包括CAR之任一態樣之某些說明性實施例中之調
節域包括共刺激域。在一些實施例中，CAR可具有大於一個調
節域（例如共調節域），或CAR之調節域（例如共調節域）可
衍生自大於一個多肽。適合包括於CAR中之調節域（例如共調
節域）長度可為約 30 個胺基酸至約 70 個胺基酸（aa），例如，
調節域（例如共調節域）長度可為約 30 aa至約 35 aa、約 35 aa
至約 40 aa、約 40 aa至約 45 aa、約 45 aa至約 50 aa、約 50 aa
至約 55 aa、約 55 aa至約 60 aa、約 60 aa至約 65 aa或約 65 aa
至約 70 aa。在其他情況下，調節域之長度可為約 70 aa至約 100
aa、約 100 aa至約 200 aa，或大於 200 aa。

[0133]

共刺激域通常增強及/或改變對活化域之活化的響應性質。適用於本發明之CAR中之共刺激域通常是衍生自受體之多肽。在一些實施例中，共刺激域同源二聚化。個體共刺激域可為跨膜蛋白之胞內部分（亦即，共刺激域可衍生自跨膜蛋白）。合適之共刺激多肽之非限制性實例包括（但不限於）4-1BB（CD137）、B7-H3、CD2、CD7、CD27、CD28、用於Lck結合（ICA）缺失之CD28、ICOS、OX40、BTLA、CD27、CD30、CD40、GITR、HVEM、LFA-1、LIGHT、NKG2C、PD-1、TILR2、TILR4、TILR7、TILR9、Fc受體 γ 鏈、Fc受體 ϵ 鏈、或與CD83 特异性結合之配位體。舉例而言，本發明之態樣之共刺激域可與4-1BB（CD137）、CD27、CD28、用於Lck結合（ICA）缺失之CD28、ICOS、OX40、BTLA、CD27、CD30、GITR或HVEM之共刺激域具有至少 80%、90%或 95%序列一致性。在一些實施例中，CAR可包括大於一個共刺激域，例如CAR可包括來自ICA的共刺激域及來自 4-1BB（CD137）的共刺激域。

[0134]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白CD137（亦稱為TNFRSF9；CD137；4-1BB；CDw137；ILA等）之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
（SEQ ID NO:1）。

在此等實施例中的一些中，共刺激域之長度為約 30 aa至約 35 aa、約 35 aa至約 40 aa、約 40 aa至約 45 aa、約 45 aa至約 50

aa、約 50 aa至約 55 aa、約 55 aa至約 60 aa、約 60 aa至約 65 aa 或約 65 aa至約 70 aa。

[0135]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白CD28（亦稱為Tp44）之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：
RSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

（SEQ ID NO:2）。在此等實施例中之一些中，共刺激域之長度為約 30 aa至約 35 aa、約 35 aa至約 40 aa、約 40 aa至約 45 aa、約 45 aa至約 50 aa、約 50 aa至約 55 aa、約 55 aa至約 60 aa、約 60 aa至約 65 aa或約 65 aa至約 70 aa。

[0136]

在一些情況下，共刺激域衍生自用於Lck結合（ICA）所缺失之跨膜蛋白CD28 的胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：
RSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPAYAAARDFAAYRS

（SEQ ID NO:3）。在此等實施例中之一些中，共刺激域之長度為約 30 aa至約 35 aa、約 35 aa至約 40 aa、約 40 aa至約 45 aa、約 45 aa至約 50 aa、約 50 aa至約 55 aa、約 55 aa至約 60 aa、約 60 aa至約 65 aa或約 65 aa至約 70 aa。

[0137]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白ICOS（亦稱為

AILIM、CD278 及CVID1) 之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO:4)。在此等實施例中之一些中，共刺激域之長度為約 30 aa至約 35 aa、約 35 aa至約 40 aa、約 40 aa至約 45 aa、約 45 aa至約 50 aa、約 50 aa至約 55 aa、約 55 aa至約 60 aa、約 60 aa至約 65 aa或約 65 aa至約 70 aa。

[0138]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白OX40 (亦稱為TNFRSF4、RP5-902P8.3、ACT35、CD134、OX-40、TXGPIL) 之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:5)。

在此等實施例中之一些中，共刺激域之長度為約 30 aa至約 35 aa、約 35 aa至約 40 aa、約 40 aa至約 45 aa、約 45 aa至約 50 aa、約 50 aa至約 55 aa、約 55 aa至約 60 aa、約 60 aa至約 65 aa或約 65 aa至約 70 aa。

[0139]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白CD27 (亦稱為S152、T14、TNFRSF7 及Tp55) 之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20

個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：

HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPE
PACSP （SEQ ID NO:6）。

在此等實施例中之一些中，共刺激域之長度為約 30 aa至約 35 aa、約 35 aa至約 40 aa、約 40 aa至約 45 aa或約 45 aa至約 50 aa。

[0140]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白BTLA（亦稱為BTLA1及CD272）之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：

CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQ
VLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASL
NHVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS （SEQ ID NO:7）。

[0141]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白CD30（亦稱為TNFRSF8、DIS166E及Ki-1）之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下序列中之約 100 個胺基酸至約 110 個胺基酸（aa）、約 110 aa至約 115 aa、約 115 aa至約 120 aa、約 120 aa至約 130 aa、約 130 aa至約 140 aa、約 140 aa至約 150 aa、約 150 aa至約 160 aa或約 160 aa至約 185 aa之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：

RRACRK RIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGA
SVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGP
SSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGR
GLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEE
GKEDPLPTAASGK (SEQ ID NO:8)。

[0142]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白 GITR（亦稱為 TNFRSF18、RP5-902P8.2、AITR、CD357 及 GITR-D）之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：
HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSA
EEKGRLGDLWV (SEQ ID NO:9)。在此等實施例中之一些中，共刺激域之長度為約 30 aa 至約 35 aa、約 35 aa 至約 40 aa、約 40 aa 至約 45 aa、約 45 aa 至約 50 aa、約 50 aa 至約 55 aa、約 55 aa 至約 60 aa、約 60 aa 至約 65 aa 或約 65 aa 至約 70 aa。

[0143]

在一些情況下，共刺激域衍生自跨膜蛋白 HVEM（亦稱為 TNFRSF14、RP3-395M20.6、ATAR、CD270、HVEA、HVEM、LIGHTR 及 TR2）之胞內部分。舉例而言，合適之共刺激域可包括與以下胺基酸序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：
CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGETVIEALQAPPDVT
TVAVEETIPSFTGRSPNH (SEQ ID NO:10)。在此等實施例中之

一些中，第一及第二多肽兩者之共刺激域之長度為約 30 aa至約 35 aa、約 35 aa至約 40 aa、約 40 aa至約 45 aa、約 45 aa至約 50 aa、約 50 aa至約 55 aa、約 55 aa至約 60 aa、約 60 aa至約 65 aa或約 65 aa至約 70 aa。

胞內活化域

[0144]

適用於本發明之CAR中之胞內活化域在活化時通常誘導產生一或多種細胞介素；增加細胞死亡；及/或增加CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、自然殺手T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞及/或嗜中性細胞之增殖。在一些實施例中，胞內活化域包括如下文所描述之至少一個（例如，一個、兩個、三個、四個、五個、六個等）ITAM基元。胞內活化域在本文中亦可稱為活化域（activating domains/activation domains）。用於基因改造訊號傳導多肽中之胞內活化域可包括多種類型之免疫訊號傳導受體之胞內訊號傳導域，包括T細胞訊號傳導蛋白，諸如CD3、B7 家族共刺激及腫瘤壞死因子受體（TNFR）超家族受體；由NK及NKT細胞諸如NKp30（B7-H6）、DAP12、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10及CD3z使用之訊號傳導域；及含有諸如Fc γ RIRI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA及FcRL5 之免疫受體酪胺酸基活化基元（ITAM）的人類免疫球蛋白受體之訊號傳導域。因此，在本發明態樣中之任一者之CAR的某些實施例中，胞內活化域是來自NKp30（B7-H6）、DAP12、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10、CD3z、Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA或FcRL5 之訊號傳導域。此等活化域在本文中分別稱為NKp30（B7-H6）活化域、DAP12 活化域、NKG2D活化域、NKp44 活化域、NKp46 活化域、DAP10 活化域、CD3z活化域、Fc γ RI活化域、Fc γ RIIA活化域、

Fc γ RIIC活化域、Fc γ RIIIA活化域或FcRL5 活化域。

[0145]

在一些實施例中，胞內活化域包括DAP10/CD28 型訊號傳導鏈。在一些實施例中，胞內活化域並未共價連接至結合CAR之膜，而相反擴散在細胞質中。作為非限制性實例，本發明之包括CAR的任何態樣之胞內活化域可為CD3Z活化域、CD3D活化域、CD3E活化域、CD3G活化域、CD79A活化域、DAP12 活化域、FCER1G活化域、DAP10/CD28 活化域或ZAP70 活化域。作為非限制性實例，本發明之包括CAR的任何態樣之胞內活化域可與如下文所描述之CD3Z、CD3D、CD3E、CD3G、CD79A、DAP12、FCER1G、DAP10/CD28 或ZAP70 域具有至少 80%、90% 或 95%的序列一致性。

ITAM

[0146]

適用於本發明之CAR中之胞內活化域包括含有免疫受體酪胺酸基活化基元（ITAM）的胞內訊號傳導多肽。ITAM基元為YX₁X₂L/I，其中X₁及X₂獨立地為任何胺基酸。在一些情況下，個體CAR之胞內活化域包括 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個ITAM基元。在一些情況下，ITAM基元在胞內活化域中重複兩次，其中ITAM基元之第一及第二個例彼此由 6 個至 8 個胺基酸（例如，(YX₁X₂L/I)(X₃)_n(YX₁X₂L/I)，其中n為整數 6 至 8，且 6 個至 8 個X₃中之每一者可為任何胺基酸）分離。在一些情況下，個體CAR之胞內活化域包括 3 個ITAM基元。

[0147]

合適之胞內活化域可為含有ITAM基元之部分，該部分衍生自含有ITAM基元之多肽。舉例而言，合適之胞內活化域可為來

自任何含有ITAM基元之蛋白質的含有ITAM基元之域。因此，合適之胞內活化域不需要含有其衍生自之整個蛋白質的整個序列。合適之含有ITAM基元之多肽的實例包括(但不限於)：CD3Z (CD3 ζ)；CD3D (CD3 δ)；CD3E (CD3 ε)；CD3G (CD3 γ)；CD79A(抗原受體複合物相關之蛋白質α鏈)；DAP12；及FCER1G (Fc ε受體 I γ鏈)。

[0148]

在一些情況下，胞內活化域衍生自T細胞表面糖蛋白CD3 ζ鏈(亦稱為CD3Z、T細胞受體T3 ζ鏈、CD247、CD3-ζ、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。舉例而言，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段或與以下胺基酸序列(2 個同功異型物)中之任一者之約 100 個胺基酸至約 110 個胺基酸(aa)、約 110 aa至約 115 aa、約 115 aa至約 120 aa、約 120 aa至約 130 aa、約 130 aa至約 140 aa、約 140 aa至約 150 aa或約 150 aa至約 160 aa之一連續段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGV
ILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL
]DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL[YNELQKDKMAEAYSEI]G
MKGERRRGKGHDGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQALPPR
(SEQ ID NO:11) 或
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGV
ILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL
]DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL[YNELQKDKMAEAYSEI]
GMKGERRRGKGHDGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQALPPR

（ SEQ ID NO:12 ） ， 其中ITAM基元用方括號表示 。

[0149]

同樣，合適之胞內活化域多肽可包括全長CD3 ζ胺基酸序列之含有ITAM基元之部分。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段或與以下胺基酸序列中之任一者之約 100 個胺基酸至約 110 個胺基酸（ aa ）、約 110 aa至約 115 aa、約 115 aa至約 120 aa、約 120 aa至約 130 aa、約 130 aa至約 140 aa、約 140 aa至約 150 aa或約 150 aa至約 160 aa之一連續段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性 的 域 ：

RVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGER
RRGKGHDGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQALPPR （ SEQ ID
NO:13 ） ；
RVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRG
RDPEMGGKPQRRKNPQEGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGE
RRRGKGHDGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQALPPR （ SEQ ID
NO:127 ） ； NQL[YNELNLGRREEYDVL]DKR（ SEQ ID NO:14 ） ；
EGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMK （ SEQ ID NO:15 ） 或
DGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQ（ SEQ ID NO:16 ） ， 其中ITAM
基元用方括號表示 。

[0150]

在一些情況下，胞內活化域衍生自T細胞表面糖蛋白CD3 δ 鏈（亦稱為CD3D；CD3-δ；T3D；CD3 抗原、δ子單元；CD3 δ；CD3d抗原、δ多肽（TiT3 複合物）；OKT3、δ鏈；T細胞受體T3

δ鏈；T細胞表面糖蛋白CD3 δ鏈等）。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段或與以下胺基酸序列中之任一者之約 100 個胺基酸至約 110 個胺基酸(aa)、約 110 aa至約 115 aa、約 115 aa至約 120 aa、約 120 aa至約 130 aa、約 130 aa至約 140 aa、約 140 aa至約 150 aa或約 150 aa至約 160 aa之一連續段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 序列一致性的域：

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELED RVFVNCNTSIT
WVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKEST
VQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGH
ETGRLSGAADTQALLRNDQV[YQPLRDRDDAQYSHL]GGNWA
RNK (SEQ ID NO:17) 或
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELED RVFVNCNTSITWV
EGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQV
HYRTADTQALLRNDQV[YQPLRDRDDAQYSHL]GGNWARNK
(SEQ ID NO:18)，其中ITAM基元用方括號表示。

[0151]

同樣，合適之胞內活化域多肽可包含全長CD3 δ胺基酸序列之含有ITAM基元之部分。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 序列一致性的域：
DQV[YQPLRDRDDAQYSHL]GGN(SEQ ID NO:19)，其中ITAM基元用方括號表示。

[0152]

在一些情況下，胞內活化域衍生自T細胞表面糖蛋白CD3 ϵ 鏈（亦稱為CD3 ϵ 、T細胞表面抗原T3/Leu-4 ϵ 鏈、T細胞表面糖蛋白CD3 ϵ 鏈、AI504783、CD3、CD3 ϵ 、T3 ϵ 等）。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段或與以下胺基酸序列之約 100 個胺基酸至約 110 個胺基酸(aa)、約 110 aa至約 115 aa、約 115 aa至約 120 aa、約 120 aa至約 130 aa、約 130 aa至約 140 aa、約 140 aa至約 150 aa或約 150 aa至約 160 aa之一連續段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 序 列 一 致 性 的 域：

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISG
TTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLK
EFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDM
SVATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGR
QRGQNKERPPPVPNPD[YEPIRKGQRDLYSGL]NQRRI (SEQ ID
NO:20)，其中ITAM基元用方括號表示。

[0153]

同樣，合適之胞內活化域多肽可包含全長CD3 ϵ 胺基酸序列之含有ITAM基元之部分。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 序 列 一 致 性 的 域：

NPD[YEPIRKGQRDLYSGL]NQR (SEQ ID NO:21)，其中ITAM
基元用方括號表示。

[0154]

在一些情況下，胞內活化域衍生自T細胞表面糖蛋白CD3 γ

鏈（亦稱為CD3 γ 、T細胞受體T3 γ 鏈、CD3- γ 、T3 γ 、 γ 多肽（TiT3複合物）等）。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段或與以下胺基酸序列之約 100 個胺基酸至約 110 個胺基酸（aa）、約 110 aa至約 115 aa、約 115 aa至約 120 aa、約 120 aa至約 130 aa、約 130 aa至約 140 aa、約 140 aa至約 150 aa或約 150 aa至約 160 aa之一連續段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：
MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVL
LTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGM
YQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFV
LAVGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQL[YQPLKDREDD
QYSHL]QGNQLRRN（SEQ ID NO:22），其中ITAM基元用方括號表示。

[0155]

同樣，合適之胞內活化域多肽可包含全長CD3 γ 胺基酸序列之含有ITAM基元之部分。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：
DQL[YQPLKDREDDQYSHL]QGN（SEQ ID NO:23），其中ITAM基元用方括號表示。

[0156]

在一些情況下，胞內活化域衍生自CD79A（亦稱為B細胞抗原受體複合物相關之蛋白質 α 鏈；CD79a抗原（免疫球蛋白相關之 α ）；MB-1 膜糖蛋白；Ig- α ；膜結合之免疫球蛋白相關之蛋

白質；表面IgM相關之蛋白質等）。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段或與以下胺基酸序列中之任一者之約 100 個胺基酸至約 110 個胺基酸(aa)、約 110 aa至約 115 aa、約 115 aa至約 120 aa、約 120 aa至約 130 aa、約 130 aa至約 140 aa、約 140 aa至約 150 aa或約 150 aa至約 160 aa之一連續段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 序 列 一 致 性 的 域：

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASL
MVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGP
GEDPNGTLIIQNVNKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLRVR
QPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQ
NEKLGLDAGDEYEDENL[YEGLNLDDCSMYEDI]SRGLQGTYQ
DVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:24) 或
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASL
MVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGP
GEDPNEPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFR
KRWQNEKLGLDAGDEYEDENL[YEGLNLDDCSMYEDI]SRGL
QGTYQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:25)，其中ITAM基
元用方括號表示。

[0157]

同樣，合適之胞內活化域多肽可包含全長CD79A胺基酸序列之含有ITAM基元之部分。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 序 列 一 致 性 的 域：

ENL[YEGLNLDDCSMYEDI]SRG (SEQ ID NO:26) ，其中ITAM
基元用方括號表示。

[0158]

在 一 些 情 況 下 ， 胞 內 活 化 域 衍 生 自 DAP12 (亦 稱 為
TYROBP ； TYRO 蛋 白 酪 胺 酸 激 酶 結 合 蛋 白 ； KARAP ； PLOSL ；
DNAX 活 化 蛋 白 12 ； KAR 相 關 之 蛋 白 質 ； TYRO 蛋 白 酪 胺 酸 激 酶
結 合 蛋 白 ； 殺 傷 活 化 受 體 相 關 之 蛋 白 質 ； 殺 傷 活 化 受 體 相 關 之
蛋 白 質 等) 。 舉 例 而 言 ， 合 適 之 胞 內 活 化 域 可 包 括 與 以 下 序 列
中 之 至 少 10 個 、 15 個 、 20 個 或 全 部 胺 基 酸 之 一 段 或 與 以 下 胺
基 酸 序 列 (4 個 同 功 異 型 物) 中 之 任 一 者 之 約 100 個 胺 基 酸 至 約
110 個 胺 基 酸 (aa) 、 約 110 aa 至 約 115 aa 、 約 115 aa 至 約 120 aa 、
約 120 aa 至 約 130 aa 、 約 130 aa 至 約 140 aa 、 約 140 aa 至 約 150
aa 或 約 150 aa 至 約 160 aa 之 一 連 續 段 具 有 至 少 50% 、 60% 、 70% 、
75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 96% 、 97% 、 98% 、 99% 或 100%
序 列 一 致 性 的 域 ：

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVL
AGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITE
TESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQRPYYK (SEQ ID NO:27) 、
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVL
AGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITET
ESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQ (SEQ ID NO:28) 、
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLT
VLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQG
QRSDVYSDL]NTQRPYYK (SEQ ID NO:29) 或
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLT
VLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQR

SDVYSDL]NTQRPYYK (SEQ ID NO:30)，其中ITAM基元用方括號表示。

[0159]

同樣，合適之胞內活化域多肽可包含全長DAP12 胺基酸序列之含有ITAM基元之部分。因此，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：ESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQ (SEQ ID NO:31)，其中ITAM基元用方括號表示。

[0160]

在一些情況下，胞內活化域衍生自FCER1G (亦稱為FCRG；Fc ε受體I γ鏈；Fc受體γ鏈；fc-ε RI-γ；fcRγ；fceRI γ；高親和力免疫球蛋白ε受體子單元γ；免疫球蛋白E受體、高親和力、γ鏈等)。舉例而言，合適之胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段或與以下胺基酸序列之約 50 個胺基酸至約 60 個胺基酸 (aa)、約 60 aa至約 70 aa、約 70 aa至約 80 aa或約 80 aa至約 88 aa之一連續段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCLRKIQVRKAAITSYEKSDGV[YTGLSTRNQETYETL]KHEKPPQ (SEQ ID NO:32)，其中ITAM基元用方括號表示。

[0161]

同樣，合適之胞內活化域多肽可包含全長FCER1G胺基酸序列之含有ITAM基元之部分。因此，合適之胞內活化域可包括與

以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性的域：DGV[YTGLSTRNQETYETL]KHE (SEQ ID NO:33)，其中ITAM 基元用方括號表示。

[0162]

適用於本發明之CAR中之胞內活化域包括DAP10/CD28 型訊號傳導鏈。DAP10 訊號傳導鏈之一實例為胺基酸序列，其為：RPRRSPAQDGKV[YINM]PGRG (SEQ ID NO:34)。在一些實施例中，合適的胞內活化域包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：RPRRSPAQDGKV[YINM]PGRG (SEQ ID NO:34)，其中，以方括號闡述值得注意的基元。

[0163]

CD28 訊號傳導鏈之一實例為胺基酸序列，其為：FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSD[YMNM]TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:35)。在一些實施例中，合適的胞內域包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSD[YMNM]TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:35)。

[0164]

適用於本發明之CAR之胞內活化域包括ZAP70 多肽，例如

合適的胞內活化域可包括與以下序列中之至少 10 個、15 個、20 個或全部胺基酸之一段具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域，或與以下胺基酸序列中之自約 300 個胺基酸至約 400 個胺基酸、自約 400 個胺基酸至約 500 個胺基酸，或自約 500 個胺基酸至約 619 個胺基酸之一連續段：

MPDPAAHLPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSL
GGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAAGGKAHCGPAELCEF
YSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVR
QTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTRE
EAERKLYSGAQTDGKFLLRPRKEQGTYALSLIYGKTVYHYLIS
QDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKLKADGLIYCLKEACPNS
SASNASGAAAPTLPAHPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSP
DKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLFLKRDNLLIADIELG
CGNFGSVRQGVYRMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMRE
AQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVG
KREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLV
NRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWYAPECINF
RKFSRSDVWSYGVTMWEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQ
GKRMECPPECPELYALMSDCWIYKWEDRPDFLTVEQRMRA
CYYSLASKVEGPPGSTQKAEACA (SEQ ID NO:36)。

額外域

[0165]

CAR可進一步包括一或多個額外多肽域，其中此等域包括但不限於訊號序列；抗原決定位標記；親和域；及產生可偵測訊號之多肽。用於本文所提供之態樣或實施例中之任一者之額

外域之非限制實例包括與如下文所描述之以下序列中之任一者具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的域：訊號序列、抗原決定位標記、親和域或產生可偵測訊號之多肽。

[0166]

適用於個體CAR（例如個體CAR之第一多肽）中之訊號序列包括任何真核訊號序列，其包括天然存在之訊號序列、合成的（例如，人造的）訊號序列等。在一些實施例中，例如，訊號序列可為CD8 訊號序列MALPVTALLPLALLHAARP（SEQ ID NO:74）。

[0167]

合適的抗原決定位標記包括（但不限於）凝血素（HA；例如YPYDVPDYA；SEQ ID NO:37）、FLAG（例如DYKDDDDDK；SEQ ID NO:38）、c-myc（例如EQKLISEEDL；SEQ ID NO:39）以及類似者。

[0168]

親和域包括可與結合搭配物（例如在固體載體上固定之一者）相互作用之適用於識別或純化的肽序列。編碼多個連續的單一胺基酸（例如組胺酸）之DNA序列當與所表現蛋白質融合時，可用於藉由高親和力結合樹脂柱（諸如瓊脂糖凝膠）之重組蛋白質的一步純化。例示性親和域包括His5（HHHHH；SEQ ID NO:40）、HisX6（HHHHHH；SEQ ID NO:41）、c-myc（EQKLISEEDL；SEQ ID NO:39）、Flag（DYKDDDDDK；SEQ ID NO:38）、Strep標記（WSHPQFEK；SEQ ID NO:42）、凝血素，例如HA標記（YPYDVPDYA；SEQ ID NO:37）、GST、硫氧還蛋白、纖維素結合域、RYIRS（SEQ ID NO:43）、Phe-His-His-Thr

(SEQ ID NO:44)、甲殼素結合域、S-肽、T7 肽、SH2 域、C-末端RNA標記、WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:45)、金屬結合域，例如鋅結合域或鈣結合域，諸如來自鈣結合蛋白質之彼等例如鈣調蛋白、肌鈣蛋白C、鈣調神經磷酸酶B、肌球蛋白輕鏈、恢復蛋白、S-調節素、視錐蛋白、VILIP、神經鈣蛋白、海馬鈣結合蛋白、聚集蛋白、鈣牽蛋白 (caltractin)、鈣蛋白酶大亞基、S100 蛋白，小白蛋白、鈣結合蛋白D9K、鈣結合蛋白D28K及鈣視蛋白、內含肽、生物素、鏈黴親和素、MyoD、Id、白胺酸拉鏈序列以及麥芽糖結合蛋白。

[0169]

合適的可偵測訊號產生蛋白質包括例如螢光蛋白、催化產生可偵測訊號作為產物之反應的酶，以及類似者。

[0170]

合適的螢光蛋白包括（但不限於）綠色螢光蛋白（GFP）或其變體、GFP之藍色螢光變體（BFP）、GFP之青色螢光變體（CFP）、GFP之黃色螢光變體（YFP）、增強型GFP（EGFP）、增強型CFP（ECFP）、增強型YFP（EYFP）、GFPS65T、Emerald、Topaz（TYFP）、Venus、Citrine、mCitrine、GFPuv、不穩定之EGFP（dEGFP）、不穩定之ECFP（dECFP）、不穩定之EYFP（dEYFP）、mCFPm、Cerulean、T-Sapphire、CyPet、Ypet、mKO、HcRed、t-HcRed、DsRed、DsRed2、DsRed-單體、J-Red、二聚體 2、t-二聚體 2(12)、mRFP1、珊瑚、Renilla GFP、Monster GFP、paGFP、Kaede蛋白質及點燃蛋白質、藻膽蛋白及藻膽蛋白偶聯物，包括B-藻紅蛋白、R-藻紅蛋白及別藻藍蛋白。螢光蛋白之其他實例包括mHoneydew、mBanana、mOrange、dTomato、tdTomato、mTangerine、mStrawberry、mCherry、mGrapel、

mRaspberry、mGrape2、mPlum (Shaner等人(2005) Nat. Methods 2:905-909)，以及類似者。適宜使用來自Anthozoan物種之多種螢光及有色蛋白質中之任一者，如例如Matz等人(1999) Nature Biotechnol. 17:969-973 中所描述。

[0171]

合適的酶包括（但不限於）辣根過氧化物酶（HRP）、鹼性磷酸酶（AP）、 β -半乳糖苷酶（GAL）、葡萄糖-6-磷酸去氫酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶、轉化酶、黃嘌呤氧化酶、螢火蟲螢光素酶、葡萄糖氧化酶（GO），以及類似者。

識別及/或消除域

[0172]

本文所揭示之CAR中之任一者可包括識別或消除域。在一些實施例中，可衍生自單純疱疹病毒衍生的酶胸苷激酶（HSV-tk）或誘導型半胱天冬酶-9，或可為FLAG抗原決定位（SEQ ID NO:38）。在一些實施例中，識別或消除域由抗體識別，該抗體由政府法規機構批准用於人類，諸如但不限於西妥昔單抗、利妥昔單抗（rituximab）或赫賽汀。在一些實施例中，識別或消除域可包括經修飾之內源細胞表面分子，如美國專利第 8,802,374 號中所描述。經修飾之內源細胞表面分子可為任何細胞表面相關之受體、配位體、糖蛋白、細胞黏著分子、抗原、整合素或經修飾之分化簇（CD）。在一些實施例中，經修飾之內源細胞表面分子為經截斷之酪胺酸激酶受體。在一個態樣中，經截斷酪胺酸激酶受體為表皮生長因子受體家族（例如ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4）中之成員，例如SEQ ID NO:78。識別或消除域可表現為亦包括CAR之單個多肽之部分。在一些實施例中，識別或消除域可在單個多肽之N端處或附近，諸如單

個多肽之N端之後。在一些實施例中，識別或消除域可在單個多肽之C端處或附近。在一些實施例中，可藉由裂解訊號或核糖體跳躍序列將C端處或附近之識別或消除域與編碼CAR之胺基酸序列隔開。裂解訊號可為此項技術中已知的任何裂解訊號。核糖體跳躍序列可為例如具有胺基酸序列 GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:77) 之 2A-1 的此項技術中已知的任何核糖體跳躍序列。在一些實施例中，識別或消除域可在CAR之域中之任一者之間，例如，在柄與跨膜域之間，或識別或消除域可在連接子中，例如單鏈抗體之重鏈與輕鏈之間的連接子。

[0173]

亦稱為EGFR、ErbB1 及HER1 之表皮生長因子受體為胞外配位體之表皮生長因子家族之成員的細胞表面受體。EGFR活性之改變已涉及某些癌症。在一些實施例中，編碼包括人類表皮生長因子受體 (EGFR) 的EGFR多肽之基因是由移除編碼包括膜遠端EGF結合域及細胞質訊號傳導尾之多肽但保留由抗EGFR抗體識別之胞外膜近端抗原決定位的核酸序列來構建的。在說明性實施例中，抗體為已知可市購的抗EGFR單株抗體，諸如西妥昔單抗、馬妥珠單抗(matuzumab)、尼西珠單抗(necitumumab) 或帕尼單抗 (panitumumab)。

[0174]

生物素標記之西妥昔單抗結合抗生物素微珠應用於免疫磁選擇成功地豐富T細胞，該T細胞已用含有EGFRt之構建體自低至 2%之群體慢病毒轉導至大於 90%的純度，而對細胞製劑無可觀測毒性。此惰性EGFR分子之組成性表現不影響T細胞表型或如由協調表現之嵌合抗原受體 (CAR)，CD19R引導之效應功

能。經由流式細胞術分析，EGFR成功地用作小鼠中之T細胞移植之體內的追蹤標記物。此外，已藉由Erbitux®介導之抗體依賴型細胞毒性（ADCC）路徑論證EGFR具有自殺基因潛力。因此，EGFR可用作具有免疫治療潛力之轉導性T細胞的非免疫基因選擇工具、追蹤標記物及自殺基因。EGFR核酸亦可藉由此項技術中熟知之方法來偵測。

[0175]

在一些實施例中，EGFR表現為亦包括CAR之單個多肽之部分。在一些實施例中，可藉由裂解訊號或核糖體跳躍序列將編碼EGFR識別域之胺基酸與編碼CAR之胺基酸隔開。裂解訊號可為此項技術中已知的任何裂解訊號。核糖體跳躍序列可為例如具有胺基酸序列GSGEGRGSLTCTGDVEENPGP(SEQ ID NO:77)之2A-1的此項技術中已知的任何核糖體跳躍序列。在一些實施例中，編碼識別域之多核苷酸序列可與CAR在相同的轉錄物上，但藉由內部核糖體進入位點與編碼CAR之多核苷酸序列隔開。

序列之重組

[0176]

在某些情況下，CAR之多肽之序列（例如CAR域）可經由使用位點特異性重組技術在細胞中經重排或缺失。在某些實施例中，可藉由位點特異性重組改變針對特定CAR的細胞活化相關之反應，例如，誘發第一活化相關之反應的CAR之第一胞內活化域可與誘發第二活化相關之反應的第二胞內活化域交換。如熟悉此項技術者將明晰，可在細胞中使用位點特異性重組以將CAR之任何域或序列與如本文所揭示之任何其他域或序列交換。如熟悉此項技術者亦將明晰，可在細胞中使用位點特異性

重組以刪除CAR之任何域或序列。序列及域之此交換及刪除此項技術中為已知的，參見例如Tone等人(2013) *Biotechnology and Bioengineering*, 3219-3226 中所描述之訊號體中的域切換，其揭示內容以引用之方式併入本文中。用於執行位點特異性重組之機制及要求亦為此項技術中所熟知的，參見例如Grindley等人(2006) *Annual Review of Biochemistry*, 567-605 及Tropp(2012) *Molecular Biology* (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, MA)，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

[0177]

CAR為藉由將上文所論述之所有不同域融合在一起以形成融合蛋白而產生的嵌合蛋白。CAR通常藉由包含聚核苷酸序列之表現載體來產生，該聚核苷酸序列編碼如本文所論述之CAR之不同域。起識別且結合目標細胞上之抗原作用的本發明之ASTR為條件活性。特定言之，相較於對應的野生型蛋白質之ASTR，ASTR在正常生理條件下為較低活性或非活性且在與目標抗原相結合之體外腫瘤替代物分析條件下為活性的。

[0178]

可藉由產生蛋白質庫且在該庫篩檢對目標抗原具有所需結合親和力之蛋白質來發現在本發明中作為ASTR，適宜全部或部分用於至少其針對目標抗原之結合域的野生型或天然蛋白質。野生型蛋白質可藉由篩檢cDNA庫來發現。cDNA庫為插入至宿主細胞之集和中之選殖cDNA（互補DNA）片段之組合，其一起構成生物體之一部分轉錄組。cDNA是自經完全轉錄之mRNA產生的且因此含有生物體之所表現蛋白質的編碼序列。cDNA庫中之資訊為藉由篩檢對目標抗原具有所需結合親和力之蛋白質之庫來發現具有所需特性之蛋白質的強大的且有用的工具。

腫瘤微環境

[0179]

實體腫瘤中之癌細胞能夠在其周圍形成腫瘤微環境以支援癌細胞之生長及轉移。腫瘤微環境為腫瘤所存在之細胞環境，包括可促進贅生性轉變、支援腫瘤生長及侵入、保護腫瘤免受宿主免疫、培養治療抗性及為休眠轉移發顯提供生態位之周圍血管、免疫細胞、纖維母細胞、其他細胞、可溶性因子、訊號傳導分子、胞外基質及機械提示。腫瘤及其周圍微環境密切相關，且不斷地相互作用。腫瘤可藉由釋放胞外訊號、促進腫瘤血管生成及誘導周邊免疫耐受影響其微環境，而微環境中之免疫細胞可影響癌細胞之生長及進化。參見 Swarts 等人「Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy」，*Cancer Res*，第 72 卷，第 2473 至 2480 頁，2012 年。

[0180]

腫瘤微環境通常為低氧的。隨著腫瘤數量增加，腫瘤內部離現有血液供應更遠生長，其致使很難向腫瘤微環境完全供氧。相較於血漿中具有約 40 mm Hg 之部分氧壓，腫瘤環境中之部分氧壓在超過 50% 局部晚期實體腫瘤中為低於 5 mm Hg。對比而言，身體之其他部位不為低氧的。低氧環境經由下調核苷酸刪除修復及錯配修復路徑導致與癌症進展相關聯的基因不穩定性。低氧亦導致低氧誘導因子 1α (HIF1- α) 之上調，其誘導血管生成，且與基因之預後不良及活化相關聯，該等基因與轉移相關聯。參見 Weber 等人「The tumor microenvironment」，*Surgical Oncology*，第 21 卷，第 172 至 177 頁，2012 年，及 Blagosklonny，「Antiangiogenic therapy and tumor progression」，*Cancer Cell*，第 5 卷，第 13 至 17 頁，2004 年。

[0181]

另外，腫瘤細胞傾向於依賴由不需要氧的乳酸發酵產生的能量。因此，腫瘤細胞不太可能使用需要氧的正常有氧呼吸。使用乳酸發酵的結果為相對於通常為中性或弱鹼性的身體的其他部位，腫瘤微環境為酸性（pH 6.5 至 6.9）。舉例而言，人類血漿之PH為約 7.4。參見Estrella等人「Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion」，*Cancer Research*，第 73 卷，第 1524 至 1535 頁，2013 年。相較於位於身體其他部位之細胞，歸因於增殖癌細胞相對較高的養分需求，腫瘤微環境中之養分可用性亦較低。

[0182]

此外，腫瘤微環境亦含有在身體的其他部位不常見的許多不同細胞類型。此等細胞類型包括內皮細胞及其前體、周細胞、平滑肌細胞、纖維母細胞、癌相關纖維母細胞、肌成纖維細胞、嗜中性細胞、嗜酸性粒細胞、嗜鹼性粒細胞、肥大細胞、T及B淋巴球、自然殺手細胞及抗原呈現細胞（APC），諸如，巨噬細胞及樹突狀細胞（Lorusso等人「The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis」，*Histochem Cell Biol*，第 130 卷，第 1091 至 1103 頁，2008 年）。

[0183]

因此，腫瘤微環境具有不同於身體其他部位之生理條件的至少若干生理條件，諸如，血漿中之生理條件。腫瘤微環境具有比身體之其他部位（尤其血漿（pH 7.4））低的pH（酸性）。腫瘤微環境具有比身體之其他部位（諸如血漿）低的氧濃度。亦，腫瘤微環境具有比身體之其他部位（尤其血漿）低的養分可用性。腫瘤微環境亦具有在身體的其他部位（尤其血漿）不

常見的一些不同細胞類型。

[0184]

在說明性實施例中，本發明之CAR包括條件活性ASTR，其自野生型生物（亦即天然）蛋白質產生，諸如，自哺乳動物生物（諸如可為用於腫瘤治療之候選者的小鼠或人類）分離的野生型或天然抗體。此類說明性實施例中之條件活性ASTR在除腫瘤微環境以外的身體部位（諸如血漿）的至少一種生理條件下比天然或野生型生物蛋白質具有較低活性，而其在腫瘤微環境中之至少一種生理條件下比天然或野生型生物蛋白質具有較高活性。此類條件活性天然或生物蛋白質可較佳地對腫瘤微環境中之癌細胞起作用以治療腫瘤，且因此不太可能產生副作用。在天然或生物蛋白質為抗原暴露於腫瘤微環境之抗腫瘤細胞表面之抗原的抗體的實施例中，條件活性抗體比身體其他部位（例如非腫瘤微環境）中之天然或野生型抗體對抗原具有較低親和力，而其比腫瘤微環境中之天然或野生型抗體對抗原具有較高親和力。此類條件活性抗體可與身體其他部位中之抗原微弱地結合或根本不與其結合，但與腫瘤微環境中之抗原較強結合，或強烈地且緊密地結合。

體外腫瘤替代物分析

[0185]

用於CAR或本發明中之ASTR及在說明性實施例中包括此類ASTR之通常本文中之CAR在腫瘤環境及/或體外腫瘤替代物分析條件下為條件活性。體外腫瘤替代物分析條件為藉由比較在體內之至少一些癌症中發現的值或含量處的條件與在生理條件下在生理組織中發現的值或含量的條件在體外測試的任何條件。在本文中之實例中提供用於相較於生理pH（例如 7.4）處於

低pH（例如 6.0 或 6.7）下之細胞裂解的非限制性體外腫瘤替代物分析。在體外腫瘤替代物分析條件下，本發明之CAR可為活性的，包括但不限於高透明質酸、乳酸及/或白蛋白，其中正常條件為低含量之乳酸、透明質酸及白蛋白。另一體外腫瘤替代物分析條件為pH，尤其特定條件中體外腫瘤替代物分析條件中之pH比正常生理pH低。舉例而言，體外腫瘤替代物分析條件之pH可在範圍之低端為在 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5 之間，且在範圍之高端為 6.6、6.7、6.8 及 6.9 之間。而生理pH可在範圍之低端為 7.2、7.3、7.4 之間，且在範圍之高端為 7.5、7.6、7.7 及 7.8 之間。在說明性實施例中，體外腫瘤替代物分析條件中之較低pH在 6.5 與 6.9 之間，且可特定言之為 6.7。生理pH可為pH 7.2 至 7.6，或可特定言之為pH 7.4。在另一實施例中，pH未改變但體外腫瘤替代物分析條件僅在乳酸濃度上不同。在另一實施例中，體外腫瘤替代物分析條件包括與生理環境相比經提高含量之腺苷。在另一實施例中，體外腫瘤替代物分析條件包括與生理環境相比經提高含量之R-2-羥基戊二酸。在另一實施例中，scFv自單株抗體之重鏈或輕鏈移植，該單株抗體通過分子進化選擇用於微環境特異性，諸如美國專利第 8709755 B2 號及申請案WO/2016/033331A1 中描述之彼等。

核酸

[0186]

本發明提供一種核酸，其包括編碼本發明之條件活性CAR之多肽的核苷酸序列。包括編碼本發明之條件活性CAR之核苷酸序列之核酸在一些實施例中將為DNA，包括例如重組表現載體。包括編碼本發明之條件活性CAR之核苷酸序列之核酸在一些實施例中將為RNA，例如體外合成之RNA。

[0187]

在一些情況下，核酸提供例如在哺乳動物細胞中產生本發明之CAR。在其他情況下，個體核酸提供編碼CAR之核酸的擴增。

[0188]

編碼本發明之CAR的核苷酸序列可操作地連接至轉錄控制元件，例如啟動子及增強子等。

[0189]

合適之啟動子及增強子元件為此項技術中已知的。對於在細菌細胞中表現，合適之啟動子包括（但不限於）*lacI*、*lacZ*、*T3*、*T7*、*gpt*、 λ P及*trc*。對於在真核細胞中表現，合適之啟動子包括（但不限於）輕鏈及/或重鏈免疫球蛋白基因啟動子及增強子元件；巨細胞病毒立即早期啟動子；單純疱疹病毒胸苷激酶啟動子；早期及晚期SV40啟動子；反轉錄病毒之長末端重複中存在之啟動子；小鼠金屬硫蛋白-I啟動子；及此項技術中已知的各種組織特異性啟動子。

[0190]

合適之可逆啟動子（包括可逆誘導型啟動子）為此項技術中已知的。此類可逆啟動子可分離且衍生自許多生物體，例如真核生物及原核生物。對用於第二生物體中之衍生自第一生物體（例如第一原核生物及第二真核生物、第一真核生物及第二原核生物，等）的可逆啟動子之修飾為此項技術中已知的。此類可逆啟動子，及基於此類可逆啟動子但亦包含其他控制蛋白之系統包括（但不限於）醇調節啟動子（例如醇去氫酶I（*alcA*）基因啟動子、對醇反式活化蛋白具有反應性之啟動子（*AlcR*）等）、四環素調節之啟動子（例如包括TetActivators、TetON、

TetOFF等之啟動子系統)、類固醇調節之啟動子(例如大鼠糖皮質激素受體啟動子系統、人類雌性激素受體啟動子系統、類視黃素啟動子系統、甲狀腺啟動子系統、蛻皮激素啟動子系統、米非司酮啟動子系統等)、金屬調節之啟動子(例如金屬硫蛋白啟動子系統等)、相關病原調節之啟動子(例如水楊酸調節之啟動子、乙烯調節之啟動子、苯并噻二唑調節之啟動子等)、溫度調節之啟動子(例如熱休克可誘導啟動子(例如HSP-70、HSP-90、大豆熱休克啟動子等))、光調節之啟動子、合成可誘導啟動子,及類似者。

[0191]

在一些情況下,含有合適之啟動子的基因座或構建體或轉基因經由對可誘導系統之誘導來進行不可逆轉換。用於誘導不可逆轉換之合適之系統為此項技術中公知的,例如,不可逆轉換之誘導可利用 Cre-lox 介導之重組(參見例如 Fuhrmann-Benzakein等人*PNAS* (2000) 28:e99,其揭示內容以引用之方式併入本文)。此項技術中已知的重組酶、內切核酸酶、連接酶、重組位點等之任何合適之組合可用於產生不可逆轉換之啟動子。本文其他處描述之用於執行位點特異性重組之方法、機制及要求用於產生不可逆轉換之啟動子且為此項技術中所熟知的,參見例如 Grindley等人(2006) *Annual Review of Biochemistry*, 567-605 及 Tropp (2012) *Molecular Biology* (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, MA),其揭示內容以引用之方式併入本文中。

[0192]

在一些情況下,啟動子為CD8細胞特異性啟動子、CD4細胞特異性啟動子、嗜中性粒細胞特異性啟動子或NK特異性啟動

子。舉例而言，可使用CD4 基因啟動子，參見例如Salmon等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7739 及Marodon等人(2003) *Blood* 101:3416。作為另一實例，可使用CD8 基因啟動子。NK細胞特異性表現可藉由使用*Neri (p46)*啟動子來實現；參見例如Eckelhart等人(2011) *Blood* 117:1565。

[0193]

在一些實施例中，例如，對於在酵母細胞中表現，合適之啟動子為組成性啟動子，諸如ADH1 啟動子、PGK1 啟動子、ENO 啟動子、PYK1 啟動子及類似者；或為可調節啟動子，諸如GALI 啟動子、GAL10啟動子、ADH2 啟動子、PH05 啟動子、CUP1 啟動子、GAL7 啟動子、MET25 啟動子、MET3 啟動子、CYC1 啟動子、HIS3 啟動子、ADH1 啟動子、PGK啟動子、GAPDH啟動子、ADC1 啟動子、TRP1 啟動子、URA3 啟動子、LEU2 啟動子、ENO啟動子、TP1 啟動子及AOX1（例如用於畢赤酵母（*Pichia*）中）。對合適之載體及啟動子的選擇在熟習此項技術者之水平之內。

[0194]

用於原核宿主細胞中之合適之啟動子包括（但不限於）噬菌體T7RNA聚合酶啟動子、trp啟動子、lac操縱子啟動子、雜合啟動子（例如lac/tac雜合啟動子、tac/trc雜合啟動子、trp/lac啟動子、T7/lac啟動子）；trc啟動子；tac啟動子及類似者；araBAD 啟動子；經體內調節之啟動子，諸如ssaG啟動子或相關啟動子（參見例如美國專利公開案第 20040131637 號）、pagC啟動子（Pulkkinen 及 Miller, *J.Bacterial.*, 1991: 173(1): 86-93 ；Alpuche-Aranda等人，PNAS, 1992; 89(21): 10079-83）、nirB啟動子（Harborne等人 (1992) *Mal. Micro.* 6:2805-2813），及類似

者(參見例如Dunstan等人 (1999) *Infect. Immun.* 67:5133-5141 ; McKelvie等人(2004) *Vaccine* 22:3243-3255 ; 及 Chatfield等人 (1992) *Biotechnol.* 10:888-892) ; $\sigma 70$ 啟動子, 例如共有 $\sigma 70$ 啟動子(參見例如Genome Accession 第 AX798980 號、第AX798961 號及第AX798183 號) ; 固定相啟動子, 例如*dps*啟動子、*spv*啟動子及類似者 ; 衍生自致病島 SPI-2 之啟動子(參見例如 WO96/17951) ; *actA*啟動子(參見例如Shetron-Rama等人(2002) *Infect. Immun.* 70:1087-1096) ; *rpsM*啟動子(參見例如Valdivia及Falkow (1996).*Mal. Microbial.* 22:367) ; *tet*啟動子(參見例如 Hillen,W.及Wissmann,A. (1989) In Saenger,W.及Heinemann,U. (編), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction*.Macmillan, 倫敦, 英國, 第 10 卷,第 143 至 162 頁); SP6 啟動子(參見例如Melton等人 (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7035) ; 及類似者。用於諸如大腸桿菌之原核生物之合適的強啟動子包括(但不限於) *Trc*、*Tac*、*T5*、*T7* 及 *P λ* 。用於細菌宿主細胞之操縱子之非限制性實例包括乳糖啟動子操縱子(當與乳糖接觸時, *Laci*抑制蛋白改變構象,從而防止*Laci*抑制蛋白與操縱子結合)、色氨酸啟動子操縱子(當與色氨酸複合時, *TrpR*抑制蛋白具有結合操縱子之構象 ; 在不存在色氨酸之情況下, *TrpR*抑制蛋白具有不結合操縱子之構象)及 *tac*啟動子操縱子(參見例如deBoer等人 (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.美國* 80:21-25)。

[0195]

編碼CAR之核苷酸序列可存在於表現載體及/或選殖載體中。在CAR包括兩個單獨多肽之情況下, 編碼兩個多肽之核苷酸序列可在相同或不同之載體中選殖。表現載體可包括選擇性

標記、複製源及提供載體之複製及/或維持之其他特徵。合適之表現載體包括例如質粒、病毒載體及類似者。

[0196]

大量合適之載體及啟動子為熟習此項技術者已知；許多在商業上可用於產生個體重組構建體。藉助於實例提供以下載體。細菌：pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA)；pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540，及pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。真核生物：pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG，及pSVL (Pharmacia)。

[0197]

表現載體通常具有位於啟動子序列附近之方便限制位點，以提供編碼異源蛋白質之核酸序列之插入。可存在於表現宿主中操作之可選擇標記。合適之表現載體包括（但不限於）病毒載體（例如基於以下之病毒載體：痘苗病毒；脊髓灰質炎病毒；腺病毒（參見例如Li等人，Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994；Borras等人，Gene Ther 6:515 524, 1999；Li及Davidson，PNAS 92:7700 7704, 1995；Sakamoto等人，H Gene Ther 5:1088 1097, 1999；WO 94/12649, WO 93/03769；WO 93/19191；WO 94/28938；WO 95/11984 及WO 95/00655）；腺相關病毒（參見例如Ali等人，Hum Gene Ther 9:81 86, 1998，Flannery等人，PNAS 94:6916 6921, 1997；Bennett等人，Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997；Jomary等人，Gene Ther 4:683 690, 1997，Rolling等人，Hum Gene Ther 10:641 648, 1999；Ali等人，Hum Mol Genet 5:591 594, 1996；WO 93/09239 中之Srivastava，

Samulski 等人，J.Vi (1989) 63:3822-3828；Mendelson 等人，Virol.(1988) 166:154-165；及 Flotte 等人，PNAS (1993) 90:10613-10617)；SV40；單純皰疹病毒； γ 反轉錄病毒；人類免疫缺陷病毒（參見例如Miyoshi等人，PNAS 94:10319 23, 1997；Takahashi等人，J Virol 73:7812 7816, 1999)；反轉錄病毒載體（例如，小鼠白血病毒、脾壞死病毒及衍生自諸如羅斯肉瘤病毒（Rous Sarcoma Virus）、哈維肉瘤病毒（Harvey Sarcoma Virus）、禽白血病毒、人類免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒及乳腺腫瘤病毒之載體）；及類似者。

[0198]

如上所述，在一些實施例中，包括編碼本發明之條件活性 CAR 之核苷酸序列之核酸在一些實施例中將為 RNA，例如體外合成之 RNA。體外合成 RNA 之方法為此項技術中已知的；可使用任何已知的方法來合成包括編碼本發明之條件活性 CAR 之核苷酸序列的 RNA。將 RNA 引入至宿主細胞中之方法為此項技術中已知的。參見例如 Zhao 等人(2010) Cancer Res. 15:9053.，將包括編碼本發明之條件活性 CAR 之核苷酸序列的 RNA 引入至宿主細胞中可在體外或離體或體內進行。舉例而言，可藉由包含編碼本發明之條件活性 CAR 之核苷酸序列的 RNA 對宿主細胞（例如，NK 細胞、細胞毒性 T 淋巴球等）進行體外或離體電穿孔。

細胞

[0199]

本發明之一些態樣包括細胞或為細胞，在說明性實例中為用作封裝細胞以製備病毒，諸如用於轉導 T 細胞及/或 NK 細胞之慢病毒顆粒。可選擇廣泛多種細胞中之任一者來在體外產生病

毒，諸如根據本發明之假型反轉錄病毒。通常使用真核細胞，尤其哺乳動物細胞，包括人類細胞，猿類細胞，犬類細胞，貓類細胞，馬類細胞及齧齒動物細胞。在說明性實例中，細胞為人類細胞。在其他說明性實施例中，細胞無限地增殖，且因此永生。可有利地用於本發明之細胞的實例包括NIH 3T3 細胞、COS細胞、Madin-Darby犬腎細胞、人類胚胎 293T細胞及衍生自此類細胞之任何細胞，諸如gpn1slacZ ϕ NX細胞，其衍生自 293T 細胞。可使用高度可轉染細胞，諸如人胚胎腎 293T細胞。「高度可轉染」是指細胞之至少約 50%、較佳地至少約 70%、最佳地至少約 80%可表現引入之DNA的基因。

[0200]

合適之哺乳動物細胞包括原代細胞及固定化細胞株。合適之哺乳動物細胞株包括人類細胞株、非人類靈長類細胞株、齧齒動物（例如小鼠、大鼠）細胞株，及類似者。合適之哺乳動物細胞株包括（但不限於）HeLa細胞（例如美國典型培養物保藏所（ATCC）第CCL-2 號）、CHO細胞（例如ATCC第CRL9618 號、第CCL61 號、第CRL9096 號）、293 細胞（例如ATCC第CRL-1573 號）、Vero細胞、NIH 3T3 細胞（例如ATCC第CRL-1658 號）、Huh-7 細胞、BHK細胞（例如ATCC第CCL10號）、PC12 細胞（ATCC第CRL1721 號）、COS細胞、COS-7 細胞（ATCC第CRL1651 號）、RAT1細胞、小鼠L細胞（ATCC第CCL1.3 號）、人類胚胎腎（HEK）細胞（ATCC第CRL1573 號）、HLHepG2 細胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK細胞株（例如NKL、NK92 及YTS），及類似者。

活化免疫細胞之方法

[0201]

本發明提供體外、體內或離體活化免疫細胞之方法。該方法通常包括使免疫細胞（體外、體內或離體）與Ax1及/或Ror2接觸，其中該免疫細胞已經基因方式修飾以產生（亦即表現）本發明之條件活性CAR。在Ax1及/或Ror2之存在下，條件活性CAR活化免疫細胞，從而產生經活化之免疫細胞。免疫細胞包括例如細胞毒性T淋巴球、NK細胞、CD4⁺ T細胞、T調節（Treg）細胞， γ δ T細胞、NK-T細胞、嗜中性粒細胞等。在說明性實施例中，免疫細胞為T細胞或NK細胞，在特定說明性實施例中，免疫細胞為包括NK-T細胞之T細胞。在此類說明性實施例中，活化通常為活化T細胞或NK細胞之細胞毒性活性。可使用複數個免疫細胞（例如T細胞或NK細胞）執行此類方法。在另外說明性實施例中，接觸包括使表現Ax1及/或Ror2之目標哺乳動物細胞與免疫細胞接觸。可藉由偵測T細胞或NK細胞之細胞介素之釋放（諸如IFN- γ 或IL-2之釋放），增加T細胞及/或NK細胞抗表現Ax1或Ror2之細胞的細胞毒性活性，增加T細胞或NK細胞中之IFN γ 及/或IL-2之胞內表現，及增加如藉由螢光活化之細胞分選（FACS）分析量測T細胞或NK細胞之CD107a及/或CD69之表現偵測用於活化T細胞或NK細胞之此類方法。本文中之實例1、3及4提供偵測T細胞及/或NK細胞之活化之此等方法中的一些的細節。

[0202]

本文所提供的之另外態樣包括將免疫細胞（例如T細胞或NK細胞）結合至目標哺乳動物細胞之方法，其包括將目標哺乳動物細胞與體外、體內或離體中之免疫細胞接觸，其中目標哺乳動物細胞表現Ax1及/或Ror2，且免疫表現與Ax1或Ror2結合之本文所提供的之CAR中之任一者。此類結合可活化免疫細胞。

可使用複數個免疫細胞（例如T細胞或NK細胞）執行此類方法。在本文中之實例 1、實例 3 及實例 4 中提供用於結合之方法，如藉由偵測由細胞介素之釋放及細胞毒性活性增加之T細胞或NK細胞之活性所偵測。

[0203]

在本文中之說明性實施例中，結合或活化免疫細胞之接觸方法包括接觸在pH低於 7.4 的微環境中之免疫細胞（例如T細胞或NK細胞）。舉例而言，pH可低於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9，或在 5.8 至 7.0 範圍內，在說明性實施例中，在範圍之低端在 6.0 至 6.8 範圍內、在 6.1 至 6.9 範圍內、在 6.2 至 6.8 範圍內，或在 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 與 6.5 之間，及在範圍之高端為 6.6、6.7、6.8 及 6.9 之間。在此類說明性實施例中，CAR為識別本文所提供之Ax1或Ror2 之本文所揭示之CAB-CAR中之任一者。

[0204]

將經基因方式修飾之免疫細胞（例如T淋巴球、NK細胞）與Ax1及/或Ror2 接觸可使由免疫細胞產生之細胞介素與在不存在Ax1及/或Ror2 時由免疫細胞所產生之細胞介素之量相比增加至少約 10%、至少約 15%、至少約 20%、至少約 25%、至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 75%、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 5 倍、至少約 10 倍，或大於 10 倍。將經基因方式修飾之免疫細胞（例如T淋巴球、NK細胞）與Ax1及/或Ror2 接觸可使由免疫細胞產生之細胞介素與在不存在Ax1及/或Ror2 時由免疫細胞所分泌之細胞介素之量相比增加至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 75%、至少 2 倍、至少 2.5 倍、至少 5 倍、至

少 10 倍，或大於 10 倍。產量可增加之細胞介素包括但不限於 IL-2 及 IFN- γ 。

[0205]

將經基因方式修飾之免疫細胞（例如細胞毒性T淋巴球）與 AAR接觸可使細胞毒性細胞之細胞毒性活性與在不存在 Ax1及/或Ror2 時細胞毒性細胞之細胞毒性活性相比增加至少約 10%、至少約 15%、至少約 20%、至少約 25%、至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 75%、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 5 倍、至少約 10 倍，或大於 10 倍。

[0206]

將經基因方式修飾之免疫細胞（例如細胞毒性T淋巴球）與 Ax1及/或Ror2 接觸可使細胞毒性細胞之細胞毒性活性與在不存在Ax1及/或Ror2 時細胞毒性細胞之細胞毒性活性相比增加至少約 10%、至少約 15%、至少約 20%、至少約 25%、至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 75%、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 5 倍、至少約 10 倍，或大於 10 倍。

[0207]

在其他實施例中，例如，取決於宿主免疫細胞，使經基因方式修飾之宿主細胞與抗原接觸可增加或減少細胞增殖、細胞存活、細胞死亡及類似者。

用於製備/分離條件活性抗原特異性靶向區之方法

[0208]

在說明性實施例中，本文所揭示之抗 Ax1及抗 Ror2 抗原受體為條件活性，使得其表現對於 Ax1或Ror2 在相較於 7.4（正常生理條件）之 pH 6.7（腫瘤環境之例示性 pH及/或處於體外腫瘤替代物分析條件）處之增加之結合。在本文揭示之任何態樣之一

些說明性實施例中，自初始多肽庫識別條件活性抗Ax1或抗Ror2 ASTR，而無需篩選/進化之前突變/進化庫之成員及/或無需視情況存在之重複輪次篩選期間或之間突變。在其他實施例中，藉由包括突變/進化之方法識別條件活性抗Ax1或抗Ror2 ASTR，且在一些實施例中，從野生型抗體開始。例示性跨膜域及胞內活化域可為本文針對CAR所揭示之彼等中之任一者。

[0209]

在一個態樣中，本文提供一種用於選擇條件活性抗Ax1或抗Ror2 ASTR之方法，其包含藉由以下步驟淘選多肽展示庫：

[0210]

a. 使多肽顯示庫在pH 7.4（或其他正常生理條件）處進行Ax1或Ror2 結合分析及在pH 6.7（或其他體外腫瘤替代物分析條件）處進行Ax1或Ror2 結合分析；及

[0211]

b. 選擇在與pH為pH 7.4 相比，pH為 6.7 下表現出Ax1或Ror2 結合活性增加之多肽，從而選擇條件活性抗原特異性靶向區。

[0212]

在一些實施例中，執行單輪選擇以獲得條件活性抗Ax1或抗Ror2 靶向區。在某些實施例中，在識別在體外腫瘤替代物分析條件下結合抗原並且在生理條件下不結合之游離抗體或表現具有此等性質之測試抗體的細胞或藉由在初始或上一輪中具有此類性質之測試抗體塗覆之噬菌體之後重複篩選或淘選方法。在一些方法中，收集之噬菌體用於感染亦可藉由輔助噬菌體感染之細胞，以便擴增收集之噬菌體。在測試細胞表面上之抗體之其他方法中，可使收集之細胞生長以藉由擴增編碼多肽之細胞中之抗體來「擴增」由細胞表現之抗體。在一些實施例中，藉

由生長表現所識別之抗體的細胞來完成擴增，而無需進行處理以在各輪之間突變編碼所識別之抗體的抗體。因此，接著藉由擴增含有編碼此等收集之抗體的抗體的細胞來富集前一輪中收集之抗體。

[0213]

淘選或篩選方法可進行單次，或重複 1 次至 1000 次。在說明性實施例中，淘選重複 1 次至 20 次或 2 次至 10 次或 2 次至 5 次。

[0214]

在其他方法中，在各輪淘選之間使用一或多輪突變/進化來產生條件活性抗 Axl 或抗 Ror2 ASTR。在一個方法中，例如藉由產生多肽或蛋白質庫並篩選該多肽或蛋白質庫得到具有對目標抗原之所要結合親和力之多肽或蛋白質來識別野生型蛋白質（亦即抗體）。在野生型蛋白質為抗體之一些實施例中，可藉由產生及篩選多株或單株抗體庫（包括噬菌體顯示抗體庫，例如噬菌體顯示人源化抗體庫）發現野生型抗體。

[0215]

可藉由使野生型蛋白質或編碼野生型蛋白質之核酸序列進行突變誘發處理以產生突變多肽群來產生進化之抗 Axl 或 Ror2 ASTR，該等突變多肽可經篩選以識別在腫瘤環境及/或體外腫瘤替代物分析條件中具有與正常生理環境相比增加之活性（例如增大的對目標抗原的結合親和力）的突變 ASTR。此類方法之實例提供於 WO2016033331（「CONDITIONALLY ACTIVE CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR MODIFIED T CELLS」）或美國專利第 8,709,755 號中。

[0216]

使用本文提供之方法識別之條件活性抗Ax1或抗Ror2 ASTR通常為多肽，且更具體而言為多肽抗體，且在說明性實施例中為單鏈抗體，如在本文中更詳細論述。此等多肽可在體外腫瘤替代物分析條件及正常生理條件下以更高或更低親和力與Ax1或Ror2 結合，但在說明性實施例中，在體外腫瘤替代物分析條件下以比正常條件下更高之親和力結合。在一些實施例中，此等多肽在體外腫瘤替代物分析條件下可以與生理（即正常）條件相比高 10%、20%、25%、50%、75%、90%、95%或 99%之親和力來結合其同源抗原。在一些實施例中，使用本文提供之方法識別的ASTR在正常生理條件下不結合同源抗原達到其使用陰性對照（諸如陰性對照抗體）獲得之背景含量以上的任何可檢測含量。

[0217]

藉由本文提供之方法分離之編碼條件活性抗Ax1或抗Ror2 ASTR的核苷酸序列可藉由對表現條件活性抗Ax1或抗Ror2 抗原特異性靶向之收集細胞的核苷酸進行定序來測定。接著可藉由產生編碼包含條件活性抗Ax1或抗Ror2 抗原特異性靶向區、跨膜域及胞內活化域之多肽的聚核苷酸來將此核苷酸序列資訊用於製備條件活性抗Ax1或抗Ror2 生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）。條件活性抗Ax1或抗Ror2 抗原特異性靶向區可經選殖至CAR構建體表現系統中，其可用以在其基因組中產生包括CAR之重組慢病毒，且接著重組慢病毒可用於轉導T細胞來在與正常生理條件相比之腫瘤選擇性環境中測試表現靶細胞殺傷之CAR介導的Ax1或Ror2，如本文之實例 1 中所說明。

用於產生條件活性細胞之方法

[0218]

本發明提供一種產生條件活性細胞之方法。該方法大致上包括藉由表現載體（例如質粒或病毒）或包括編碼本發明之條件活性CAR之核苷酸序列的RNA（例如體外轉錄的RNA）來以基因方式修飾哺乳動物細胞。經基因方式修飾之細胞在Ax1及/或Ror2之存在下為條件活性的。基因修飾可在體內、體外或離體進行。細胞通常為免疫細胞（例如T淋巴球、T輔助細胞或NK細胞）、幹細胞、先驅細胞等。在說明性實施例中，細胞為T細胞。

[0219]

在一些情況下，離體進行基因修飾。舉例而言，自受試者獲得T淋巴球、幹細胞、T輔助細胞或NK細胞；且將自受試者獲得之細胞進行基因方式修飾以表現本發明之CAR。經基因方式修飾之細胞在Ax1及/或Ror2之存在下為條件活性的。在一些情況下，經基因方式修飾之細胞經離體活化。在其他情況下，將經基因方式修飾之細胞引入受試者（例如自其獲得細胞之受試者）；且經基因方式修飾之細胞在體內活化。舉例而言，當Ax1及/或Ror2存在於受試者之細胞表面上時，不需要投與抗原。經基因方式修飾之細胞與存在於受試者之細胞表面上的抗原接觸，且活化經基因方式修飾之細胞。舉例而言，當經基因方式修飾之細胞為T淋巴球時，經基因方式修飾之細胞可對於在CAR結合之其表面上表現Ax1及/或Ror2之細胞展現細胞毒性。

[0220]

在一個態樣中，在本文中提供製備包含嵌合抗原受體（CAR）以條件上結合Ax1或Ror2之條件活性T細胞及/或NK細胞的離體方法，其中該方法包含：

a) 富集周邊血單核細胞(PBMC)以使包含T細胞及/或NK細胞

胞之PBMC與分離血液分離；

b) 在有效條件下活化經富集PBMC之T細胞及/或NK細胞；

c) 在有效條件下使用非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導經活化T細胞及/或NK細胞，從而產生經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞，其中非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒各自包含反轉錄病毒基因組，該反轉錄病毒基因組包含可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子的一或多個核酸序列，其中該一或多個核酸序列中之第一核酸序列編碼根據本文所提供之任一實施例之CAB-CAR；及

d) 擴增經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞，從而製備條件活性T細胞及/或NK細胞。

[0221]

在以上態樣之一些實施例中，該方法進一步包括採集經擴增之經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞。在以上態樣之一些實施例中，該方法進一步包括在富集PBMC之前自個體收集血液。在另外實施例中，該方法進一步包括將經採集、經擴增之經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞引入至個體中。在另外實施例中，在將經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞引入至個體1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或14天之後其存在於個體中。

血液收集

[0222]

可藉由本領域已知之任何合適方法自個體收集或獲取含有PBMC之血液。舉例而言，可藉由靜脈穿刺或收集血液及/或PBMC樣本的任何其他血液收集方法來收集血液。在一些實施例中，可藉由血球分離獲得PBMC，如下文所論述。

PBMC之富集

[0223]

在製備條件活性T細胞及/或NK細胞之離體方法中，包括T細胞及/或NK細胞之周邊血單核細胞（PBMC）在富集步驟中與血液樣本之其他組分分離。可使用此項技術中已知之任何方法例如使用血球分離及/或密度梯度離心來執行自其他血液組分及血細胞之PBMC富集。在一些實施例中，可使用Ficoll-Paque（GE Healthcare）。在一些實施例中，使用自個體採集血液之自動血球分離器，使血液穿過挑選出周邊細胞類型（諸如，PBMC）之裝置，且使剩餘部分返回至個體中。密度梯度離心可在血球分離之後執行。在一些實施例中，可使用去除白血球的過濾器件富集及分離PBMC。在一些實施例中，接著根據細胞表型（亦即陽性選擇）將磁珠活化細胞分類術用於純化來自PBMC之特異性細胞群（諸如，T細胞及/或NK細胞）。在一些實施例中，可使用本領域已知之方法自PBMC移除單核球及/或巨噬細胞。關於待治療之個體，細胞可為異體性及/或自體性的。在PBMC富集過程期間，可在分離且隨後活化經富集之PBMC之前如本領域所已知執行一或多次洗滌。洗滌溶液可為適用於洗滌血液及/或PBMC之任何溶液。根據此項技術中已知之方法，可在任何合適的基礎培養培養基中再懸浮經分離PBMC以培養T細胞及/或NK細胞。在一些實施例中，培養基可補充HSA、人類AB+血清、源自個體之血清及/或血清替代物。

PBMC之活化

[0224]

製備本文中所提供之條件活性T細胞及/或NK細胞之離體方法通常包括用一或多種活化試劑活化或刺激經分離之PBMC以

產生經活化之T細胞及/或NK細胞的步驟。可對新鮮經分離PBMC或先前經冷凍保存之PBMC執行活化。在使用經冷凍保存之細胞的情形下，可在使用前使用已研發之方法融解細胞。

[0225]

通常在活化期間存在培養基，諸如此項技術中已知用於離體處理的彼等（作為非限制性實例，X-VIVO 15（Lonza））或CTS培養基（Thermo Fisher）。在一些實施例中，培養基可補充HSA、人類AB+血清、源自個體之血清及/或血清替代物。在說明性實施例中，培養基可補充血清替代物，諸如CTS血清替代物（Thermo Fisher）。在一些實施例中，培養基可補充HSA、人類AB+血清、源自個體之血清及/或血清替代物。

[0226]

可將一或多種活化試劑的任何組合添加至培養基以產生經活化之T細胞及/或NK細胞。通常形成反應混合物以執行活化。在一些實施例中，可藉由將一或多種活化試劑添加至培養基形成反應混合物。在本文所揭示之實施例中之任一者中，以有效量使用一或多種活化試劑，使得產生經活化之T細胞及/或NK細胞。

[0227]

值得注意的是在製備條件活性T細胞及/或NK細胞之實施例中之此類活化可包括在pH低於7.0處使用Axl或Ror2（諸如經分離可溶性Axl或Ror）活化細胞。然而，在製備條件活性T細胞及/或NK細胞之方法中之活化通常利用更多基因活化試劑。因此，在一些實施例中，活化試劑可為靶向或結合T細胞刺激或共刺激分子、T細胞介素或任何其他合適的分裂素（例如十四醯基佛波醇乙酸酯（TPA）、植物血凝素（PHA）、伴刀豆球蛋白A（conA）、

脂多醣（LPS）、商陸分裂素（PWM）之多肽或抗體（例如抗CD2、抗CD3 及/或抗CD28）或其功能性片段，T細胞刺激或共刺激分子、磷酸抗原或胺基雙磷酸鹽（諸如唑來膦酸鹽（zoledronate））之天然配位體。各種抗體或其功能性片段在此項技術中已知為活化或刺激T細胞及/或NK細胞。在一些實施例中，可將一或多種抗體或其功能性片段固定在實體表面上，諸如珠粒。

T細胞及/或NK細胞之轉導

[0228]

製備本文中所提供之條件活性T細胞及/或NK細胞之離體方法通常包括轉變或轉導經活化T細胞及/或NK細胞的步驟。在此類方法之一些實施例中，使T細胞及/或NK細胞與諸如非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒之表現載體離體接觸，從而以基因方式修飾T細胞及/或NK細胞。不受理論限制，在接觸時段期間，非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒在反轉錄病毒與宿主細胞膜開始融合時與T細胞及/或NK細胞結合。接著，經由轉導程序，來自非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒之基因材料進入T細胞及/或NK細胞，且通常併入至宿主細胞DNA中。因此，此類方法包括藉由轉導以基因方式修飾T細胞及/或NK細胞。在此項技術中已知用於活體外用非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒（諸如非複製勝任型重組慢病毒顆粒）轉導T細胞及/或NK細胞的方法。例示性方法描述於例如Wang等人(2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701，Cooper等人(2003) *Blood.* 101:1637-1644、Verhoeyen等人(2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114 及Cavalieri等人(2003) *Blood.* 102(2): 497-505 中。在一些實施例中，可使T細胞及/或NK細胞與非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒接觸。在

說明性實施例中，可使T細胞及/或NK細胞與非複製勝任型重組慢病毒顆粒接觸。

經轉導之T細胞及/或NK細胞之擴增

[0229]

在製備本文中所提供之條件活性T細胞及/或NK細胞之離體方法之說明性實施例中，在採集之前擴增經轉導T細胞及/或NK細胞。在本文中所揭示之實施例中之任一者中，培養基存在用於活化及轉導，且可在轉導之後進一步添加或交換以執行擴增。在一些實施例中，可將培養基添加至在活化期間形成之反應混合物。用於擴增之培養基通常包括用於活化或轉導之相同基礎培養基，諸如此項技術中已知用於離體處理的彼等，尤其用於T細胞及/或NK細胞（作為非限制性實例，X-VIVO 15（Lonza）或Optimizer CTS培養基（Thermo Fisher）。在一些實施例中，培養基可補充HSA、人類AB+血清、源自個體之血清及/或血清替代物，諸如CTS血清替代物（Thermo Fisher）。可在活化、轉導及擴增之前、期間及/或之後將諸如IL-2、IL-7或IL-15之細胞介素或HAS中發現之彼等細胞介素添加至培養基。細胞擴增可執行一定天數。在一些實施例中，細胞擴增可執行4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天。在一些實施例中，擴增可執行範圍之低端為4、5、6、7或8天與範圍之高端為9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天之間。在某些說明性實施例中，擴增執行6與12天之間，或8與10天之間。

細胞採集

[0230]

製備本文中所提供之條件活性T細胞及/或NK細胞之離體方

法通常包括在擴增之後採集經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞。在一些實施例中，可在採集期間使用此項技術中已知之方法濃縮或收集經轉導之T細胞及/或NK細胞。在一些實施例中，可在採集期間使用此項技術中已知之任何適合之洗滌溶液洗滌T細胞及/或NK細胞一或多次。在採集結束時，可將T細胞及/或NK細胞再懸浮於此項技術中已知之任何適合培養基中。在本文中所揭示之實施例中之任一者中，可基於擴增完成標準執行經擴增之T細胞及/或NK細胞的採集。在一些實施例中，擴增完成標準可為乳酸鹽濃度、細胞密度或擴增之天數。

[0231]

在一些實施例中，可將所採集之細胞引入、引回、再引入、注輸或再注輸至個體中。在一些實施例中，可將所採集之細胞如下文所描述在再引入至個體中之前冷凍保存。在說明性實施例中，將所採集之細胞引入、引回、再引入、注輸或再注輸至個體中而無需首先冷凍保存該等細胞。個體通常不是收集血液之同一個體。

[0232]

貫穿本發明中經轉導之T細胞及/或NK細胞包括經轉導細胞之保持在活體外轉導期間被併入至細胞中之核酸中之至少一個的子代。在引用「再引入」經轉導細胞之本文中之方法中，應理解，此類細胞在其自個體之血液收集時通常並不處於經轉導狀態。

細胞引入/再引入

[0233]

在製備本文中所揭示之條件活性T細胞及/或NK細胞之離體方法的某些實施例中，可將所採集之T細胞及/或NK細胞引入、

引回、再引入、輸注或再輸注於個體中以獲得治療效果。待再引入之T細胞及/或NK細胞之數量可為預定劑量，其可為治療有效劑量。在一些實施例中，預定劑量可視在細胞上表現之CAR（例如，在經轉導之T細胞及/或NK細胞上表現之抗原特異性靶向區的親和力及密度）、靶細胞之類型、正經治療之疾病或病理狀況的性質，或其組合而定。在一些實施例中，所採集之細胞的預定劑量可基於個體之質量，例如每千克個體之細胞數（細胞/千克）。

細胞冷凍保存

[0234]

在製備本文中所提供之條件活性T細胞及/或NK細胞之離體方法中，可以預定劑量冷凍保存藉由本文中所描述之方法產生之所採集細胞以供稍後使用。用於冷凍保存細胞之方法及試劑為此項技術中熟知的。冷凍保存可包括一或多次洗滌及/或濃縮T細胞及/或NK細胞之步驟。方法亦可包括形成冷凍保存混合物之步驟，該混合物包括含T細胞及/或NK細胞之稀釋溶液及適合之冷凍保存溶液。在一些實施例中，方法可包括此項技術中已知之冷凍該冷凍保存混合物之步驟。融解經冷凍保存之T細胞及/或NK細胞之方法為此項技術中已知的。

用於藉由改變pH來調節表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞活性之方法

[0235]

在本文中之某些態樣中提供調節免疫細胞（例如T細胞或NK細胞）之活性的方法，其藉由在pH低於 7.0（例如低於 6.9 或 6.8）的微環境中使免疫細胞與Axl或Ror2接觸，且接著改變微環境中之pH，使得其為或高於 7.0（例如高於 7.1、7.2 或 7.3），

其中免疫細胞表現本文所提供之CAB-CAR中之任一者。在說明性實施例中，Ax1或Ror2 在目標哺乳動物細胞之表面上表現。在某些實施例中，用於調節活性之此類方法與用於活化本文所提供的之免疫細胞之方法相同，進一步包含將微環境之pH增大至為或高於 7.0（例如高於 7.1、7.2 或 7.3）之pH的額外步驟，從而降低免疫細胞之活性。在說明性實施例中，pH之此類增大使免疫細胞去活化。

[0236]

在本文中之某些態樣中提供藉由在微環境（包括目標組織內或一或多個非靶向（例如健康/正常）組織內之靶細胞）內產生pH變化或偏移，藉由調節CAB-CAR與該等靶細胞上之同源抗原的結合來調節表現CAB-CAR之T細胞或NK細胞與靶細胞之結合及產生靶細胞之裂解/殺傷的方法，其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位。此類方法通常包括在微環境中使諸如哺乳動物細胞（例如人類細胞）之靶細胞與表現CAB-CAR之T細胞或NK細胞接觸，且接著藉由降低或更通常地增加pH來改變微環境之pH。微環境可為目標微環境，例如腫瘤或目標外微環境，其中目標外結合可產生副作用。在一些實施例中，此類方法可提供瞬時降低之對腫瘤微環境敏感之CAR-T靶向結合。

[0237]

因此，在一個態樣中，本文提供用於表現調節條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之T細胞或NK細胞與表現個體中之CAB-CAR之同源抗原之細胞之結合的方法，該方法包括以下：

a. 將包含編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞引入至個體中，其中在引入之後（及視情況及/或期間），包括編碼

CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR且與表現個體中之同源抗原之細胞結合，其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位；及

b.以充足量將藥用試劑投與至個體以升高血液pH及/或組織之pH及/或微環境之pH，其中該投與在引入之前、期間或之後執行，且其中血液、組織及/或微環境之升高的pH調節表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與表現具有升高的pH之血液、組織或微環境中之同源抗原之細胞的結合。

[0238]

在包括投與本發明之pH調節藥用試劑之步驟的態樣中，pH之變化/偏移可藉由將靶向或非靶細胞/組織暴露於pH調節藥用試劑來實現，例如藉由向個體投與pH調節藥用試劑。本文提供pH調節藥用試劑之非限制性實例。在某些態樣中，本文提供在用於調節CAB-CAR與其同源抗原結合或用於調節表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與表現其同源抗原之細胞結合或用於減少或減輕個體中靶向腫瘤外毒性之方法中使用的藥用試劑。在某些實施例中，此類態樣是關於治療腫瘤生長、癌症、增生或細胞增殖性疾病。

[0239]

在其他態樣中，本文提供pH調節藥用試劑之用途，其用於製備用於控制經基因方式基因改造之T細胞及/或NK細胞與個體中之目標哺乳動物細胞在活體內之結合的藥物或套組中，其中靶細胞表現Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位。在其他態樣中，本文提供一種套組，其包括含有非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒之容器及其用於執行治療腫瘤生長之方法的說明書，其中該說明書指示藉由調節pH來控制T細胞及/

或NK細胞與靶目標哺乳動物細胞之結合的方法，其中目標哺乳動物細胞表現Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位。此類方法可為本文此部分提供之用於藉由改變pH來調節表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞結合及/或活性之方法中之任一者。含有重組反轉錄病毒顆粒之容器可為用於儲存重組反轉錄病毒顆粒及/或pH調節藥用試劑之管、小瓶、孔板，或其他容器。此等容器中之任一者可具有工業強度及等級。在某些實施例中，該套組可包括兩個或更多個容器。一個容器（container/vessel）可包括重組反轉錄病毒顆粒且另一容器可包括pH調節藥用試劑。在此類方法中，藥用試劑以足夠之量經遞送/投與以增加血液pH及/或組織pH及/或微環境pH以調節表現CAB-CAR之經修飾/重組T細胞及/或NK細胞之CAB-CAR與具有增加之pH的血液及/或組織中之同源抗原之結合。本文提供用於以足夠量投與pH調節藥用試劑且持續足夠時間之非限制性例示性細節。

[0240]

在將CAB-CAR引入至個體中之後，無論相對於組織靶向或目標外之靶細胞，均可與諸如pH調節藥用試劑之pH調節劑接觸。因此，本文提供之用於調節能夠結合（亦即識別）Ax1多肽或其抗原決定位或Ror2 多肽或其抗原決定位之表現CAB-CAR之T細胞之結合及/或細胞毒性活性（例如用於減輕目標外腫瘤活性及/或用於抑制諸如腫瘤細胞增殖之靶細胞增殖）之例示性態樣可包括以下步驟：

a. 將包含編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞引入至個體中，其中在引入之後，包含編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR，其中CAB-CAR能夠與Ax1多肽或

其抗原決定位或Ror2 多肽或其抗原決定位結合，且視情況與表現個體中之同源抗原之細胞結合；及

b.以足夠量將藥用試劑投與至個體以提高血液pH及/或組織pH及/或微環境pH以調節表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與表現具有增加之pH的血液、組織或微環境中之CAB-CAR之同源抗原之細胞的結合。將理解，取決於用以將編碼CAB-CAR之核酸引入至T細胞及/或NK細胞中之具體方法，T細胞及/或NK細胞可或可不在其經引入至個體中之前表現CAB-CAR。然而，在引入至個體中之後的一些時間點下，例如，2 小時、4 小時、8 小時、12 小時、1 天、2 天、4 天及/或 7 天或更長時間，包括編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR。接著，此類細胞通常結合表現CAB-CAR之同源抗原的靶細胞。

[0241]

本文提供之用於以基因方式修飾及視情況擴增個體之淋巴球的方法可用於將編碼CAB-CAR之核酸序列引入至個體之T細胞及/或NK細胞之基因組中以產生能夠表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞，且接著將能夠表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞引入至個體中，其中在引入之後，T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR，以便使CAB-CAR與靶細胞/組織接觸。本發明提供如何執行此等方法以及用於不同CAR組分之各種替代方案的細節，其中之任一者可用於本發明之態樣，包括改變pH以調節表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與表現CAB-CAR之同源抗原的靶細胞之結合。

[0242]

用於以基因方式修飾及擴展淋巴球之此類方法通常涉及使T細胞及/或NK細胞與非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒接觸以

轉導該等T細胞及/或NK細胞。此類接觸通常在自個體移除淋巴球之後離體進行。接著將T細胞及/或NK細胞引入/再引入至通常已移除其之個體中。非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒包括具有編碼CAB-CAR之聚核苷酸的基因組。關於此類非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒之許多替代實施例及其他細節提供在本文其他部分中，且可用於本文提供之方法中，該方法以取決於pH之方式藉由調節表現由CAB-CAR識別之同源目標多肽之細胞之微環境中的pH來調節能夠與Axl多肽或其抗原決定位或Ror2 多肽或其抗原決定位結合之表現CAB-CAR之T細胞結合及產生其之裂解/殺傷。

[0243]

用於調節藉由表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與靶細胞之結合的此類方法可用以例如藉由增加個體內之血液及/或非腫瘤組織之pH來降低目標上腫瘤外毒性。舉例而言，在個體內之「正常」組織pH變得瞬間降低之情況下，可以正常組織的pH增加同時腫瘤之pH保持較低且仍處於表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞結合目標腫瘤細胞之pH下的方式來遞送pH調節劑。在此等實施例中，可以較低濃度或以靶向方式將pH調節劑遞送至正常組織。

[0244]

在一些實施例中，此可完成同時使腫瘤微環境內之pH保持足夠低以使CAB-CAR T細胞及/或NK細胞與腫瘤內之其同源目標表現細胞結合。在本文所提供之方法之說明性態樣中，組織之pH保持在表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與其目標結合一段時間之pH下，該時間足以使表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞接觸且結合表現其同源抗原之細胞（例如 2 小時、4 小時、

8 小時、12 小時或 24 小時，或 2 天、4 天、7 天、14 天、28 天或 30 天，或 1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月、6 個月、12 個月、24 個月，或更長時間)，且接著使 pH 偏移/改變，例如藉由使組織之 pH 提高至一程度以影響表現 CAB-CAR 之 T 細胞及/或 NK 細胞與靶細胞之結合。

[0245]

因此，在一個態樣中，本文提供一種經由藥物改變血管及組織 pH 來瞬時降低腫瘤微環境敏感性 CAR-T 細胞目標結合之方法，其中 CAR-T 細胞表現能夠與 Axl 多肽或其抗原決定位或 Ror2 多肽或其抗原決定位結合之 CAB-CAR。CAR-T 細胞中的此等微環境受控之 ASTR 提供額外含量之保護以避免目標上腫瘤外毒性，需要腫瘤局部環境條件實現 T 細胞接合。儘管對於一些單株抗體療法具有吸引力，但接受性細胞療法可產生對其 CAR-T 目標瞬時容許之局部環境。舉例而言，在具有低 pH 之組織中活化之 CAR-T 細胞可進一步降低微環境之 pH，取決於 CAR 構建體中存在之細胞質域。在其他情況下，與接受性細胞療法相關之細胞介素釋放綜合征及其他病狀可導致血液之碳酸氫鹽緩衝能力損失，從而引起乳酸性酸中毒。已確立藉由靜脈內輸注投與之接受性細胞療法產生暫時性肺壓迫。對於一些細胞療法，輸注速率需要持續監測溶解氧 (Fischer 等人 *Stem Cells Dev.* 2009 年 6 月；18(5): 683–691)。肺壓迫程度取決於細胞大小、活化狀態、細胞劑量及輸注速率。Cruz 等人 (*Cytotherapy*. 2010 年 10 月；12(6): 743–749) 報導來自超過 300 個 T 細胞輸注之不良發現，低劑量及緩慢輸注可減少肺壓迫。然而，藉由某些高效 CAR-T 細胞，甚至以低含量存在於肺內皮上之目標，諸如 Her2 (Morgan 等人 *Mol Ther.* 2010 年 4 月；18(4): 843–851)，可產

生不可控制之立即毒性，且由於輸注後肺中之初始高CAR-T細胞濃度以及此等組織中T細胞目標之存在而使得患者急劇惡化。在其他情況下，T細胞目標在諸如膽管之其他目標外組織中之存在可能產生不可控制之目標上腫瘤外毒性（*Lamers Mol Ther.* 2013 年 4 月；21(4):904-12）且在可使用諸如類固醇之其他試劑或細胞消除抗原決定位之前產生嚴重器官毒性。儘管靜脈及動脈血漿對酸中毒具有強緩衝能力，但呼吸性酸中毒、休克、代謝性酸中毒及缺血性酸中毒之條件可發生於藉由接受性細胞療法治療之癌症患者中。

[0246]

在本文提供之一些態樣中，CAB-CAR在個體中之結合可藉由向個體投與藥用試劑來調節，以提高或降低血液、組織及/或微環境之pH。在一些態樣中，可藉由向個體投與藥用試劑以提高或降低血液pH及/或組織之pH及/或微環境之pH來在個體中減輕靶向腫瘤外毒性。在一些態樣中，T細胞及/或NK細胞與目標哺乳動物細胞之結合可藉由引入藥劑以提高或降低血液pH及/或組織之pH及/或微環境之pH來控制。在一些態樣中，可藉由向個體投與pH調節藥用試劑來控制個體活體內之經基因改造之T細胞及/或NK細胞與目標哺乳動物細胞之結合。在說明性實施例中，藥用試劑可提高血液pH及/或組織之pH及/或微環境之pH。在一些實施例中，微環境可為活體內微環境。在說明性實施例中，微環境可為腫瘤微環境。在一些實施例中，微環境可包括目標哺乳動物細胞，其中目標哺乳動物細胞在其表面上表現目標抗原。在一些實施例中，向個體投與藥用試劑可將血液、組織及/或微環境之pH自小於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9 之pH增加至至少 6.6、6.7、6.8、6.9、

7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5 或 7.6 之 pH，其中血液、組織及/或微環境之 pH 在投與藥用試劑之前低於投與藥用試劑之後。在一些實施例中，向個體投與藥用試劑可將血液、組織及/或微環境之 pH 自高於 6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5 或 7.6 之 pH 降低至低於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 之 pH，其中血液、組織及/或微環境之 pH 在投與藥用試劑之前高於投與藥用試劑之後。在一些實施例中，向個體投與藥用試劑可在個體之血液、組織及/或微環境中產生 pH 偏移。在一些實施例中，pH 偏移可為在任一方向上之至少 0.1 pH 單位、0.2 pH 單位、0.3 pH 單位、0.4 pH 單位、0.5 pH 單位、0.6 pH 單位、0.7 pH 單位、0.8 pH 單位、0.9 pH 單位、1.0 pH 單位、1.1 pH 單位、1.2 pH 單位、1.3 pH 單位、1.4 pH 單位、1.5 pH 單位、1.6 pH 單位、1.7 pH 單位,或 1.8 pH 單位，即在投與藥用試劑之後的 pH 相對於投與藥用試劑之前的 pH 提高或降低。在說明性實施例中，pH 偏移為 pH 增加。

[0247]

本發明之 CAB-CAR 可在一個 pH 下而非不同 pH 下減小與其同源抗原之結合力。在針對 CAB-CAR 之差異性結合之說明性 pH 值未曾提供於最廣泛態樣中之說明性實施例中及替代地對於替代用於此類態樣之彼等值的其他實施例，CAB-CAR 可在較高 pH 下而非較低 pH 下具有降低之結合力。舉例而言，CAB-CAR 可在 pH 為高於 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5 下而非低於 pH 為 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 下減小與其同源抗原之結合力。在其他實施例中，CAB-CAR 可在較高 pH 下而非較低 pH 下具有減小的結合力。舉例而言，CAB-CAR 可在低於 pH 為 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 下而非高於 pH 為 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4

或 7.5 下具有與其同源抗原之減小之結合力。在一些說明性實施例中，相比於 pH 7.4 至 7.6，CAB-CAR 在 6.5 至 6.7 之 pH 下呈現增大的結合力。在其他說明性實施例中，相比於 pH 為 7.4，CAB-CAR 在 pH 為 6.7 下呈現增大的結合力。在其他實施例中，相比於血液之 pH，CAB-CAR 在腫瘤之 pH 下呈現增大的結合力。在一些實施例中，CAB-CAR 可包括抗原特異性靶向區、柄及胞內活化域。在一些實施例中，CAB-CAR 亦可包括共刺激域。在一些實施例中，CAB-CAR 可與腫瘤相關之抗原結合。在一些實施例中，CAB-CAR 與 Ax1 多肽或其抗原決定位或 Ror2 多肽或其抗原決定位結合。

[0248]

在包括調節血液、組織或微環境之 pH 的方法中，可將微環境之 pH 自低於 pH 為 7.0 增大至高於 pH 為 7.0。舉例而言，pH 可自低於 pH 為 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 增大至高於 pH 為 7.0、7.1、7.2、7.3 或 7.4。在一些實施例中，CAB-CAR 可在引入藥用試劑之前在增大的 pH 下而非微環境之 pH 下與同源抗原結合。在某些實施例中，pH 可自低於 pH 為 7.0 增大至 pH 為 7.1 至 8.0、或至 pH 為 7.1 至 7.8、或至 pH 為 7.2 至 7.8、或至 pH 為 7.2 至 7.6、或至 pH 為 7.3 至 7.6、或至 pH 為 7.4 至 7.8、或至 pH 為 7.4 至 7.6。視投與之藥用試劑之類型及劑量而定，此 pH 之增大可發生少於 1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、12 小時或 24 小時，或多於 1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、12 小時或 24 小時。在某些實施例中，投與藥用試劑以使得 pH 在目標組織（諸如腫瘤）中，及例如在目標組織（例如腫瘤）微環境之至少一個表面中，在目標組織（例如腫瘤）微環境之至少部分中以及在說明性實施例中在整個目標組織（例如腫瘤）

微環境中維持高於 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5；或在 7.0、7.1、7.2、7.3 之範圍的低端與 7.4、7.5、7.6、7.7 或 7.8 之範圍的高端之間。微環境可為活體內微環境，諸如腫瘤、組織、非腫瘤組織、正常組織或經歷瞬時pH偏移之組織。舉例而言，典型地經歷pH瞬時變化之組織包括厭氧條件中之肌肉組織或經歷鍛煉之肌肉組織或已發炎組織或正經歷發炎之組織。在包括目標哺乳動物細胞之一些實施例中，目標哺乳動物細胞可為腫瘤細胞或非腫瘤細胞或正常細胞。

[0249]

在一些態樣中，提供用於瞬時增加血管pH以降低微環境受控之CAB-CAR之親和力之方法，該微環境受控之CAB-CAR識別，能夠結合，且在一些實施例中，結合Ax1多肽或其抗原決定位或Ror2 多肽或其抗原決定位。血液pH之 0.4U偏移可使形成CAB-CAR之一部分之某些scFv對其同源抗原之親和力降低超過10 倍。在一些實施例中，可經由各種藥用試劑之IV或口服投與途徑來實現治療性pH控制。舉例而言，在一些實施例中，可藉由碳酸氫鹽或碳酸氫鈉來實現結合親和力之失活。在其他實施例中，可使用三羥甲基胺基甲烷（亦稱為緩血酸胺（tromethamine/trometamol）及THAM）及/或Carbicarb™（碳酸氫鈉和碳酸鈉之等莫耳高滲溶液）可以足以減輕目標上腫瘤外毒性之量來提高血液中之pH。在又其他實施例中，可使用小分子質子泵抑制劑以足以減輕目標上腫瘤外毒性之量來提高血液pH及/或組織pH。可用於包括調節pH之方法中之質子泵抑制劑包括（但不限於）埃索美拉唑（esomeprazole）（Nexium）、埃索美拉唑及萘普生（naproxen）（Vimovo）、蘭索拉唑（lansoprazole）（Prevacid）、奧美拉唑（omeprazole）（Prilosec及Zegerid）及雷

貝拉唑（rabeprazole）（Aciphex）。質子泵抑制劑之投與可在更長之時間內有效地用於調節抗原結合域與其同源抗原之結合親和力持續數天，數周，數月或數年。在其他實施例中，抗原結合域對其同源抗原之親和力可藉由控制轉運體及泵之轉錄、轉譯、膜表現及穩定性來改變血液pH及/或組織pH來調節。經改變表現可調節pH之此類轉運體及泵之實例包括（但不限於）質子泵、鈉質子交換家族（NHE）、碳酸鹽轉運體家族（BCT）及單羧酸轉運體家族之成員。

[0250]

在某些實施例中，在輸注患者之表現條件活性生物ASTR（例如scFv或scFvFc）之CAR-T細胞之前或同時投與pH調節藥用試劑，諸如碳酸氫鹽、THAM或CaricarbTM。此類治療將減輕另外與CAR-T細胞輸注之暫時性肺壓迫相關之即時細胞毒性。因此，在某些態樣中，本文提供藉由向個體投與足以提高血液pH及/或組織pH及/或微環境pH之量的藥用試劑；且同時或隨後（例如之後1小時、2小時、4小時、6小時、8小時、12小時或24小時，或1天、2天、3天、4天或7天）將表現CAB-CAR之T細胞或NK細胞引入至個體中來減少對個體之正常、健康組織造成之細胞毒性之方法。在某些實施例中，在此類引入之後的目標時間（例如1小時、2小時、4小時、6小時、8小時、12小時或24小時，或1天、2天、3天、4天或7天后），持續在一段時間內或無限期終止投與藥用試劑，以便改變個體之血液、組織或微環境之pH並調節表現CAB-CAR之T細胞之結合/活性。

[0251]

可以使用各種有效的投藥方案來投與能夠調節pH之藥用試

劑（例如提高個體之血液pH值及/或組織pH及/或微環境pH），如熟練的業內人士將理解。在本文中，投藥可指示給予個體藥用試劑，包括經由IV將藥用試劑注射至個體中，或向個體或服用藥用試劑之個體提供口服劑量之藥用試劑。藥用試劑可投與至個體或患者持續各種時間長度，例如至少 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天或 6 天；1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、7 周、8 周、9 周、10 周或 11 周；3 個月、4 個月、5 個月、6 個月、7 個月、8 個月、9 個月、10 個月、12 個月、15 個月或 18 個月；或 2 年、2.5 年、3 年、3.5 年、4 年、4.5 年或 5 年或無限期。在一些實施例中，藥用試劑可為碳酸氫鹽、碳酸氫鈉（ NaHCO_3 ）或碳酸氫鈉及碳酸鈉的溶液，且腸胃外或IV劑量可為： $0.2 \times \text{個體體重 (kg)} \times \text{個體之鹼缺失}$ ；所需 $\text{HCO}_3^- (\text{mEq}) = 0.5 \times \text{重量 (kg)} \times [24 - \text{血清HCO}_3^- (\text{mEq/L})]$ ；或 2 mEq/kg至 5 mEq/kg IV輸注持續 4 至 8 小時。在一些實施例中，可取決於酸中毒之嚴重程度使用碳酸氫鹽、碳酸氫鈉及碳酸氫鈉溶液之標準投藥方案。舉例而言，可經由IV以 1 公升/小時至 1.5 公升/小時之速率來投與稀釋於 1L之 5%右旋糖於水中之 50 mEq至 150 mEq碳酸氫鹽。在其他非限制性實例中，可經由IV以 1 公升/小時至 1.5 公升/小時之速率來投與稀釋於 1L之 5%右旋糖於水中之 90 mEq至 180 mEq碳酸氫鹽。在其中藥用試劑為碳酸氫鹽或碳酸氫鈉（ NaHCO_3 ）之一些實施例中，腸內或口服劑量可為例如給予個體之 325 mg至 2000 mg碳酸氫鈉 1 次/天至 4 次/天。

[0252]

在一些實施例中，藥用試劑可為三羥甲基胺基甲烷（亦稱為緩血酸胺（tromethamine/trometamol）和THAM），且胃腸外或IV劑量可估計為：所需緩血酸胺溶液（0.3 M之mL）=體重（kg）

×鹼缺失（毫克當量/公升）×1.1。在一些實施例中，可自藉助於 Siggaard-Andersen 列線圖測定之 mEq/L 之細胞外液之緩衝液鹼缺失（以 mEq/L 為單位）來估計三羥甲基胺基甲烷之 IV 劑量。在一些實施例中，初始劑量可為通過緩慢 IV 輸注至多 1000 mL 來注射之 500 ml（150 mEq）三羥甲基氨基甲烷，其中最大劑量為 500 mg/kg（227 mg/lb）持續不少於一小時之時間。

[0253]

在一些實施例中，藥用試劑可為小分子質子泵抑制劑，且可投與持續延長之治療長度。舉例而言，可投與小分子質子泵抑制劑持續至少 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天或 6 天；1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、7 周、8 周、9 周、10 周或 11 周；3 個月、4 個月、5 個月、6 個月、7 個月、8 個月、9 個月、10 個月、12 個月、15 個月或 18 個月；或 2 年、2.5 年、3 年、3.5 年、4 年、4.5 年或 5 年或無限期。在一些實施例中，質子泵抑制劑可為埃索美拉唑（Nexium），且可每天一次或兩次經口投與 20 mg 或 40 mg 埃索美拉唑。在一些實施例中，質子泵抑制劑可為埃索美拉唑（Nexium）與萘普生（Vimovo）之組合，且可每天一次或兩次經口投與 20 mg 埃索美拉唑與 375 mg 至 500 mg 萘普生。在一些實施例中，質子泵抑制劑可為蘭索拉唑（Prevacid），且可每天一次或兩次經口投與 15 mg、30 mg 或 60 mg 蘭索拉唑。在一些實施例中，可藉由 IV 每天一次歷經 30 分鐘注射 30 mg 蘭索拉唑來投與蘭索拉唑並持續至多 7 天。接著個體可切換至口服蘭索拉唑並繼續治療。在一些實施例中，質子泵抑制劑可為奧美拉唑（Prilosec 及 Zegerid），且可每天一次或兩次經口投與 10 mg、20 mg 或 40 mg 奧美拉唑。在一些實施例中，質子泵抑制劑可為雷貝拉唑（Aciphex），且可每天一次或

兩次經口投與 20 mg或 60 mg雷貝拉唑或可每天一次經口投與 100 mg雷貝拉唑。在本文所揭示之實施例中之任一者中，藥用試劑可彼此組合使用。

[0254]

在本文所揭示之實施例中之任一者中，可在投與藥用試劑之前、期間或之後量測個體之血液、組織及/或微環境之pH。在一些實施例中，向個體投與或繼續投與藥用試劑以增大或降低pH之決定可基於個體之血液、組織及/或微環境之pH量測值。用於量測個體之血液pH及/或血液之碳酸氫鹽含量之方法為此項技術中熟知的。在一些實施例中，可使用正電子發射斷層攝影法（PET）、磁共振光譜（MRS）、磁共振成像（MRI）及光學成像來量測微環境中之體內pH，例如腫瘤中（關於測量腫瘤pH之細節，參見：Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. Tumor pH and its measurement.J Nucl Med. 2010 年 8 月；51(8):1167-70）。

[0255]

在另一態樣中，本文提供一種減輕個體之目標上腫瘤外毒性之方法，其包括以下：

a. 將編碼條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之聚核苷酸引入至個體之T細胞或NK細胞中以產生能夠表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞，其中CAB-CAR能夠與Axl多肽或其抗原決定位或Ror2 多肽或其抗原決定位結合；

b. 將能夠表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞引入至個體中，其中T細胞及/或NK細胞在個體中表現CAB-CAR；及

c. 以充足量將藥用試劑投與至個體以升高血液pH及/或組織之pH及/或微環境之pH以調節CAB-CAR與其具有升高的pH之血液、組織及/或微環境中之同源抗原之結合，藉此減輕個體中之

目標上腫瘤毒性。

[0256]

在引入步驟中，T細胞或NK細胞能夠表現能夠與Ax1多肽或其抗原決定位或Ror2多肽或其抗原決定位結合之CAB-CAR，此是因為其經基因方式修飾以含有編碼CAB-CAR之核酸。此基因修飾可為在藉由轉染或轉導而引入T細胞或NK細胞內之載體上存在CAB-CAR編碼序列。在說明性實施例中，編碼CAB-CAR之核酸經整合至T細胞或NK細胞之基因組中。

[0257]

設想此項技術中已知的用於將聚核苷酸引入T細胞及/或NK細胞之各種方法可與本文提供之方法一起用於包括使用諸如pH調節藥用試劑來改變pH以影響CAB-CAR T細胞或NK細胞與細胞上之其同源抗原結合的態樣（在本文中有時稱為「pH切換態樣」）。通常，載體（在說明性實施例中為表現載體）用於遞送聚核苷酸。此類載體可包括此項技術中已知的用於向T細胞及/或NK細胞遞送核酸之各種載體。本發明之說明性態樣利用反轉錄病毒載體及反轉錄病毒顆粒，及（在一些特別說明性實施例中）慢病毒載體及（在說明性實施例中）重組慢病毒顆粒。

[0258]

其他適合之表現載體可用於本文提供之pH切換態樣。此類表現載體包括（但不限於）病毒載體（例如基於以下之病毒載體：痘苗病毒；脊髓灰質炎病毒；腺病毒（參見例如Li等人，Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543-2549, 1994；Borrás等人，Gene Ther 6:515-524, 1999；Li及Davidson，PNAS 92:7700-7704, 1995；Sakamoto等人，H Gene Ther 5:1088-1097, 1999；WO 94/12649, WO 93/03769；WO 93/19191；WO 94/28938；WO 95/11984 及

WO 95/00655)；腺相關病毒(參見例如Ali等人，Hum Gene Ther 9:81 86,1998，Flannery等人，PNAS 94:6916 6921, 1997；Bennett等人，Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997；Jomary等人，Gene Ther 4:683 690, 1997，Rolling等人，Hum Gene Ther 10:641 648, 1999；Ali等人，Hum Mol Genet 5:591 594, 1996；WO 93/09239 中之Srivastava，Samulski等人，J.Vi (1989) 63:3822-3828；Mendelson等人，Virology (1988) 166:154-165；及Flotte等人，PNAS (1993) 90: 10613-10617)；SV40；單純疱疹病毒；或反轉錄病毒載體(例如，小鼠白血病病毒、脾壞死病毒及衍生自諸如羅斯肉瘤病毒、哈維肉瘤病毒、禽白血病病毒、人類免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒及乳腺腫瘤病毒之反轉錄病毒的載體)，例如 γ 反轉錄病毒；或人類免疫缺陷病毒(參見例如Miyoshi等人，PNAS 94:10319 23, 1997；Takahashi等人，J Virol 73:7812 7816, 1999)；及類似者。

[0259]

在一些實施例中，利用含DNA之病毒顆粒代替重組反轉錄病毒顆粒。此類病毒顆粒可為腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒、巨細胞病毒、痘病毒、牛痘病毒、流感病毒、水泡性口炎病毒(VSV)，或辛德畢斯病毒。熟練的業內人士將理解如何修改本文揭示之用於不同病毒及反轉錄病毒之方法。在使用包括DNA基因組之病毒顆粒時，熟練的業內人士將理解，此等基因組中可包括功能單元以誘導將病毒顆粒之全部或部分DNA基因組整合至用此類病毒轉導之T細胞及/或NK細胞之基因組中。替代地，功能性DNA可經遞送至在細胞中表現但不整合至T細胞及/或NK細胞之基因組中之T細胞和/或NK細胞。

[0260]

在說明性實施例中，在本發明之pH切換態樣中使用之載體為重組反轉錄病毒顆粒，且在某些實施例中為重組慢病毒顆粒。此類反轉錄病毒顆粒通常包括位於病毒包膜內之衣殼內的反轉錄病毒基因組。在本文之各個部分中之本發明提供重組反轉錄病毒顆粒之各種實施例，其揭示可包含於重組反轉錄病毒顆粒之表面上或在重組反轉錄病毒顆粒之基因組內及/或中之元件。此等重組反轉錄病毒顆粒實施例中之任一者可用於本文所提供之pH切換態樣中。

[0261]

在上文所揭示之實施例中之任一者中，與CAB-CAR結合之同源抗原可為Ax1多肽或其抗原決定位或Ror2 多肽或其抗原決定位。在一些實施例中，同源抗原可為與Ax1多肽或其抗原決定位或Ror2 多肽或其抗原決定位之至少 10 個、15 個、20 個或所有胺基酸之一段具有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性之多肽。如本文中所揭示，能夠與Ax1多肽或其抗原決定位或Ror2 多肽或其抗原決定位結合之CAB-CAR通常在pH為 6.7 下而非pH為 7.4 下以較高結合親和性結合其同源抗原。因此，本發明之此類抗ROR2 及抗AXL CAB-CAR通常在腫瘤微環境而非具有生理pH之正常組織中以較高結合親和力與其同源抗原結合。

治療方法

[0262]

本發明提供治療包括本文所提供之抗Ax1或抗Ror2 CAB-CAR之病症的各種方法。在一些實施例中，該等方法利用本發明之CAB-CAR之事實，在存在於T淋巴球或NK細胞中或由

其表現時，可介導對靶細胞之細胞毒性。在某些目標條件下，本發明之CAB-CAR結合靶細胞上存在之抗原，從而藉由經基因方式修飾以產生CAB-CAR之T淋巴球或NK細胞介導靶細胞之殺傷。CAB-CAR之ASTR通常結合存在於靶細胞之表面上的抗原。

[0263]

靶細胞包括(但不限於)癌細胞。因此，本發明提供殺傷或抑制目標癌細胞之生長之方法，該方法包括使經基因方式修飾以產生個體CAR之細胞毒性免疫效應細胞（例如，細胞毒性T細胞或NK細胞）接觸，使得T淋巴球或NK細胞識別存在於目標癌細胞之表面上之抗原，且介導對靶細胞之殺傷。此類方法之說明性態樣提供治療癌症之方法。CAB-CAR不限用於治療癌症，且可適用於一或多種指征，包括治療循環障礙、關節炎、多發性硬化症、自身免疫疾病、皮膚疾病、病毒疾病及病症及用於各種診斷類型。

[0264]

在某些態樣中，本發明提供一種治療患有癌症之個體體內之癌症的方法。如此，本發明提供抗癌症（尤其表現使用本文所使用之抗Ax1及抗Ror2 CAB-CAR之Ax1或Ror2）之接受性細胞療法的方法。因此，在一個態樣中，該方法包括以下：步驟A：將經組態以表現編碼如本文所提供之針對Ax1或Ror2之CAB-CAR之聚核苷酸序列的表現載體引入至獲自個體之周邊血細胞以產生經基因改造之細胞毒性細胞(諸如，T細胞或NK細胞)；及步驟B：將該經基因改造之細胞毒性細胞投與至個體。在本文中提供處理T細胞以活化、轉導及通常擴增提供以上步驟A之說明性實施例的此類細胞的具體方法。

[0265]

癌症通常分別表現 Ror2 或 Axl，且在說明性實施例中，癌症為此類癌細胞表現 Ror2 及/或 Axl 之任何癌症，諸如腎上皮細胞癌。CAR 可為識別本文所揭示之 Axl 或 Ror2 之 CAB-CAR 中之任一者，尤其對表現此等抗原之癌細胞具有細胞毒性之彼等。可藉由轉導包括具有載體之 T 細胞及/或 NK 細胞之周邊血白細胞將編碼抗 Axl CAB-CAR 或抗 Ror2 CAB-CAR 之表現載體引入至周邊血細胞中。在某些說明性實施例中，載體為重組病毒，諸如在一些實施例中為重組慢病毒之重組反轉錄病毒。在一些實施例中，癌症為表現 Ror2 之軟組織肉瘤或間皮瘤且個體（例如軟組織肉瘤患者或間皮瘤患者）之 T 細胞及/或 NK 細胞使用抗 Ror2 CAR（例如本文所揭示之抗 Ror2 CAB-CAR）轉導。

[0266]

用於治療本文所提供之病症的方法通常包括向個體投與表現本文所提供之抗 Axl 或抗 Ror2 CAB-CAR 之經基因方式修飾之 T 細胞或 NK 細胞。該投與可為例如靜脈內投與、皮下投與或腫瘤內投與。在經基因方式修飾之 T 細胞及/或 NK 細胞為靜脈內投與的方法中，通常以用於腸胃外投與之合適之緩衝劑遞送在 1×10^4 細胞/kg 與 1×10^8 細胞/kg 之間的細胞。在經基因方式修飾之 T 細胞及/或 NK 細胞為腫瘤內投與的方法中，通常等滲溶液遞送在 1×10^6 個細胞與 5×10^8 個細胞之間。

[0267]

在一些實施例中，投與在介白素或其經修飾版本之投與之前、伴隨及/或之後。舉例而言，本發明提供之一些實施例包括 IL-2 或 IL-2 之經修飾版本之共投與，該 IL-2 或 IL-2 之經修飾版本持續釋放及/或與偏向 T 細胞之活化增殖及/或殺傷活性之某些 IL-2 受體。舉例而言，某些實施例中之經修飾 IL-2 為聚乙二醇

化IL-2，且可為NKTR-214（Nektar Therapeutics, San Francisco, CA）。在其他實施例中，經修飾IL-2為ALKS 4230（Alkermes, Inc.）。

[0268]

可適於本文所揭示之方法之療法的癌包括（但不限於）食管癌、肝癌、基底細胞癌（皮膚癌之一種形式）、鱗狀細胞癌（各種組織）、包括移行細胞癌（惡性膀胱腫瘤）之膀胱癌、支氣管癌、結腸癌、大腸癌、胃癌、包括小細胞肺癌及非小細胞肺癌之肺癌、腎上腺皮質癌、甲狀腺癌、胰腺癌、乳房癌、卵巢癌、前列腺癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳突癌、乳突腺癌、囊腺癌、髓質癌、腎細胞癌、乳腺管原位癌或膽管癌、絨膜癌、精細胞瘤、胚胎癌、威爾姆式腫瘤（Wilm's tumor）、宮頸癌、子宮癌、睪丸癌、成骨癌、上皮癌及鼻咽癌。

[0269]

可適於本文所揭示之方法之療法的肉瘤包括（但不限於）纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肉瘤、軟骨肉瘤、脊索瘤、成骨肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管內皮肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤因肉瘤（Ewing's sarcoma）、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤及其他軟組織肉瘤。

[0270]

可適於本文所揭示之方法之療法的其他固體腫瘤包括（但不限於）神經膠質瘤、星形細胞瘤、神經管胚細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果腺瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、黑色素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤。

[0271]

可適於本文所揭示之方法之療法的白血病包括（但不限於）a)慢性骨髓增生性症候群（多潛能造血幹細胞贅生性病）；b)急性骨髓性白血病（多潛能造血幹細胞或限制譜系潛能之造血幹細胞之贅生性轉變）；c)慢性淋巴球白血病（CLL；免疫不成熟及功能不完全之小淋巴球之克隆增殖），包括B細胞CLL、T細胞CLL幼淋巴球白血病及毛細胞白血病；及d)急性淋巴球白血病（其特徵為淋巴母細胞累積）。可使用標的物方法治療之淋巴瘤包括（但不限於）B細胞淋巴瘤（例如，伯基特淋巴瘤（Burkitt's lymphoma））；霍奇金淋巴瘤（Hodgkin's lymphoma）；非霍奇金淋巴瘤及其類似者。

[0272]

可適於根據本文所揭示之方法治療之其他癌症包括非常型脊膜瘤(頭)、胰島細胞癌(胰臟)、髓質癌(甲狀腺)、間質瘤(腸)、肝癌(肝)、肝母細胞瘤(肝)、透明細胞癌(腎)及神經纖維瘤縱膈。

組合療法

[0273]

在一些實施例中，CAR細胞作為佐劑療法投與至標準癌症療法。標準癌症療法包括手術(例如，手術移除癌組織)、放射療法、骨髓生物移植、化學治療、抗體治療、生物反應修飾治療及上述之特定組合。

[0274]

放射療法包括(但不限於)自諸如光束之外部應用源或藉由植入較小放射源釋放之x射線或伽馬射線。

[0275]

用於癌症治療之合適之抗體包括但不限於裸抗體，例如，曲妥珠單抗（Herceptin）、貝伐珠單抗（Avastin™）、西妥昔

單抗（Erbix™）、帕尼單抗（Vectibix™）、易普利單抗（Yervoy™）、利妥昔單抗（Rituxan）、阿倫單抗（Lemtrada™）、奧法木單抗（Arzerra™）、奧戈伏單抗（OvaRex™）、彭博拉單抗（MK-3475）、帕妥珠單抗（Perjeta™）、蘭尼單抗（Lucentis™）等，及結合抗體，例如，吉妥單抗（Mylortarg™）、標記色瑞替尼 90Y 之替伊莫單抗（Zevalin™）、標記 ¹³¹I 之托西莫單抗（Adcetris™）（Bexxar™）等。用於癌症治療之合適之抗體包括但不限於抗腫瘤相關抗原產生之抗體。此類抗原包括但不限於 CD20、CD30、CD33、CD52、EpCAM、CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、CAIX、PSMA、葉酸結合蛋白質、神經節苷脂（例如，GD2、GD3、GM2 等）、Ley、VEGF、VEGFR、整合素 α -V- β -3、整合素 α -5- β -1、EGFR、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、PAP、髓生蛋白等。

[0276]

適用於與本發明之方法相關的生物反應修飾劑包括但不限於：（1）酪胺酸激酶（RTK）活性之抑制劑；（2）絲胺酸/蘇胺酸激酶活性之抑制劑；（3）腫瘤相關抗原拮抗物，諸如與腫瘤抗原特異性結合之抗體；（4）凋亡受體激動劑；（5）介白素-2；（6）干擾素 α ；（7）干擾素 γ ；（8）純系刺激因子；（9）血管生成之抑制劑；及（10）腫瘤壞死因子之拮抗劑。

[0277]

化學治療劑為非肽（亦即非蛋白質）化合物，該等非肽化合物減少癌細胞增殖且涵蓋細胞毒劑及細胞抑制劑。化學治療劑之非限制性實例包括烷化劑、亞硝基脲、抗代謝物、抗腫瘤抗生素、植物（長春花）生物鹼及類固醇激素。

[0278]

用於減少細胞增殖之試劑為此項技術中已知的且廣泛使用。此類試劑包括烷化劑，諸如氮芥（nitrogen mustard）、亞硝基脲、乙烯亞胺衍生物、烷基磺酸鹽及三氮烯，包括但不限於二氯甲基二乙胺、環磷醯胺（Cytosan™）、美法侖（L-sarcolysin）、卡莫司汀（BCNU）、洛莫司汀（CCNU）、司莫司汀（甲基-CCNU）、鏈脲菌素、氮脲菌素、脲嘧啶氮芥、氮芥（chlormethine）、異環磷醯胺、苯丁酸氮芥、呱泊溴烷、三乙撐蜜胺、三亞乙基硫代磷醯胺、二甲磺酸丁酯、甲氮咪胺及替莫唑胺。

[0279]

抗代謝劑包括葉酸類似物、嘧啶類似物、嘌呤類似物及腺苷脫胺酶抑制劑，包括但不限於阿糖胞苷（CYTOSAR-U）、阿糖胞苷、氟二氧嘧啶（5-FU）、氟脲苷（FudR）、6-硫鳥嘌呤、6-巰基嘌呤（6-MP）、噴司他丁、5-氟二氧嘧啶（5-FU）、甲胺蝶呤、10-炔丙基-5,8-二去氮雜葉酸（PDDF, CB3717）、5,8-二去氮四氫葉酸（DDATHF）、亞葉酸、氟達拉濱磷酸鹽、噴司他丁及吉西他濱。

[0280]

合適之天然產物及其衍生物（例如，長春花生物鹼、抗腫瘤抗生素、酶、淋巴因子及表鬼臼毒素）包括但不限於阿糖胞苷、紫杉醇（Taxol®）、多西紫杉醇（Taxotere®）、脫氧助間型黴素、絲裂黴素C、L天冬醯胺酶、咪唑硫嘌呤；布喹那；生物鹼，例如，長春新鹼、長春花鹼、長春瑞濱、長春地辛等；鬼臼毒素，例如，依託泊苷、替尼泊苷等；抗生素，例如，蔥環黴素、鹽酸柔紅黴素（道諾黴素、紅比黴素、柔紅黴素）、

去甲氧柔紅黴素、阿黴素、表阿黴素及嗎啉基衍生物等；吩噻嗪酮雙環肽，例如，更生黴素；鹼性糖肽，例如，博來黴素；蔥醌苷，例如，普卡黴素（光神黴素）；蔥醌，例如，米托蔥醌；吡丙吡咯吡啶二酮，例如，絲裂黴素；大環免疫抑制劑，例如，環孢黴素，FK-506（他克莫司，普樂可復）、雷帕黴素等，及類似者。

[0281]

其他抗增殖細胞毒性劑為諾維本、CPT-11、阿那曲唑、來曲唑、卡培他濱、雷洛昔芬、環磷醯胺、異環磷醯胺及屈洛昔芬。

[0282]

具有抗增殖活性之微管影響劑亦適於使用且包括但不限於同分異構秋水仙鹼（NSC 406042）、軟海綿素（NSC 609395）、秋水仙鹼（NSC 757）、秋水仙鹼衍生物（例如NSC 33410）、海兔毒素 10（NSC 376128）、美登素（NSC 153858）、根黴素（NSC 332598）、紫杉醇（Taxol®）、Taxol®衍生物、多西紫杉醇（Taxotere®）、硫代秋水仙鹼（NSC 361792）、三苯甲基半胱氨酸、硫酸長春鹼、硫酸長春新鹼、天然及合成埃博黴素，包括但不限於埃博黴素A、埃博黴素B、海綿內脂；雌氦芥、諾考達唑及類似者。

[0283]

適於使用之激素調節劑及類固醇（包括合成類似物）包括但不限於腎上腺皮質類固醇，例如，強的松、地塞米松等；雌激素及孕酮，例如，己酸炔孕酮、醋酸甲炔孕酮、醋酸甲地孕酮、雌二醇、克羅米芬、三苯氧胺等；及腎上腺皮質抑制劑，例如，氨魯米特；17 α -炔雌醇；己烯雌酚；睪丸激素；氟甲睪

酮；屈他雄酮丙酸酯；睪內酯；甲基強的松龍；甲基睪酮；潑尼松龍；去炎松；三對甲基苯氯乙烯；經孕酮；氮魯米特；雌氮芥；醋酸甲經孕酮；亮丙瑞林；氟他胺（Drogenil）；托瑞米芬（Fareston）及Zoladex®。雌激素刺激增殖及分化，因此使用結合雌激素受體之化合物用於阻斷活性。皮質類固醇可抑制T細胞增殖。

[0284]

其他化學治療劑包括金屬複合物，例如，順氯氨鉑（順DDP）、卡鉑等；脲，例如經基脲；及胍，例如，N-甲基胍；表鬼臼毒噻吩糖苷；拓撲異構酶抑制劑；甲基苄胍；米托蒽醌；亞葉酸；喃氟啟等。其他所關注之抗增殖劑包括免疫抑制劑，例如，黴酚酸、沙利度胺、脫氧司加林、氮雜孢菌素、來氟米特、咪唑立賓、氮雜螺烷（SKF 105685）；Iressa®（ZD 1839，4-(3-氯-4-氟苯基胺基)-7-甲氧基-6-(3-(4-嗎啉基)丙氧基)喹啉))等。

[0285]

「紫杉烷」包括紫杉醇以及任何活性紫杉烷衍生物或前體藥物。可利用熟習此項技術者已知之技術（亦參見WO 94/07882、WO 94/07881、WO 94/07880、WO 94/07876、WO 93/23555、WO 93/10076；美國專利第 5,294,637 號、第 5,283,253 號、第 5,279,949 號、第 5,274,137 號、第 5,202,448 號、第 5,200,534 號、第 5,229,529 號及EP 590,267）或自包括（例如）Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.（自Taxus brevifolia之T7402 或自Taxus yannanensis之T-1912）之商業來源獲得的技術容易地製備「紫杉醇」（本文應理解為包括類似物、調配物及衍生物，諸如，多西紫杉醇、TAXOL™、TAXOTER™（多西紫杉醇之

調配物)、紫杉醇之 10-脫乙醯類似物及紫杉醇之 3'-N-去苯甲醯基-3'-N-第四丁基羰基類似物)。

[0286]

應將紫杉醇理解為不但指代紫杉醇之常見可商購形式，而且指代類似物及衍生物（例如，入上文所指出之 Taxotere™ 多西紫杉醇）及紫杉醇結合物（例如紫杉醇 PEG、紫杉醇葡聚糖或紫杉醇木糖）。

[0287]

術語「紫杉烷」內亦包括多種已知衍生物，包括親水衍生物及疏水衍生物兩者。紫杉烷衍生物包括但不限於描述於國際專利申請案第 WO 99/18113 號中之半乳糖及甘露糖衍生物；描述於 WO 99/14209 中之呱嗪基及其他衍生物；描述於 WO 99/09021、WO 98/22451 及美國專利第 5,869,680 號中之紫杉烷衍生物；描述於 WO 98/28288 中之 6-硫基衍生物；描述於美國專利第 5,821,263 號中之亞磺醯胺衍生物；及描述於美國專利第 5,415,869 號中之紫杉酚。其進一步包括紫杉醇之前體藥物，包括但不限於描述於 WO 98/58927、WO 98/13059 及美國專利第 5,824,701 號中之彼等。

適用於治療之個體

[0288]

多個個體適合於用治療癌症之方法治療。適合之個體包括患有癌症、經診斷患有癌症、處於患有癌症之風險、曾患有癌症且處於癌症復發之風險、已藉由用於該癌症之藥劑治療且未能對此治療作出反應、或已藉由用於該癌症的藥劑治療但在對此治療之初步反應之後復發的任何個體，例如人類或非人類動物。

[0289]

適用於藉由免疫調節方法治療之個體包括具有自身免疫疾病之受試者；為器官或組織移植接受者及類似者之受試者；免疫缺陷之受試者；及感染病原體之受試者。

例示性實施例

[0290]

本發明提供與Axl及/或Ror2 結合之嵌合抗原受體（CAR）及包含編碼該等CAR之核苷酸序列的核酸以及結合Axl及Ror2之條件活性CAR。本發明提供經基因修飾以產生CAR之細胞及用於製備此類細胞之方法。本發明之CAR可以各種方法使用，亦提供該等方法，包括用於執行接受性細胞療法，諸如CAR療法，例如針對癌症（例如腎上皮細胞癌）之CAR療法之方法。

[0291]

在以下實施例中提供為本發明之態樣之一些非限制性例示性實施例：

[0292]

實施例 1.一種用於結合Axl或Ror2 之嵌合抗原受體（CAR），其包含：

- a) 條件活性抗原特異性靶向區（ASTR），其相比於pH為7.4，在pH為6.7下顯示出對Axl或Ror2增加的結合力；
- b) 跨膜域；及
- c) 胞內活化域。

[0293]

實施例 A1.一種用於結合Axl或Ror2 之嵌合抗原受體（CAR），其包含：

- a)顯示在相較於正常生理環境之腫瘤微環境及/或體外腫瘤

替代物分析條件下活性增加（亦即更大）之條件活性抗原特異性靶向區（ASTR），其中ASTR與Ax1或Ror2結合；

b) 跨膜域；及

c) 胞內活化域。

[0294]

實施例A2.如實施例 1 或A1 中之任一者或（除非另外明確敘述）根據本文所提供之任何其他實施例之CAR，其中ASTR選自抗體、抗原、配位體、配位體之受體結合域、受體、受體之配位體結合域，及親和體。

[0295]

實施例A3. 實施例A2 或（除非另外明確敘述）根據本文所提供之任何其他實施例之CAR，其中ASTR為抗體片段。

[0296]

實施例A4.如實施例 1 或A1 至A3 或（除非另外明確敘述）根據本文所提供之任何其他實施例之CAR，其中條件活性ASTR顯示在相對於對應的生理條件之腫瘤微環境及/或體外腫瘤替代物分析條件下抗體結合之增加，其中腫瘤微環境及/或體外腫瘤替代物分析條件選自由以下組成之群組：低氧、酸性pH、較高濃度之乳酸、較高濃度之透明質酸、較高濃度之白蛋白、較高濃度之腺苷、較高濃度之R-2-羥基戊二酸及較低養分可用性。

[0297]

實施例A5.如實施例A1 至A4 中之任一者或（除非另外明確敘述）根據本文所提供之任何其他實施例之CAR，其中相較於在pH為 7.4 下，條件活性ASTR在pH為 6.7 下顯示抗原結合力之增大（或更大）。

[0298]

實施例A6.如實施例 1 或A1 至A5 中之任一者或（除非另外明確敘述）根據本文所提供之任何其他實施例之CAR，其中胞內活化域為人類CD3Z活化域、人類CD3D活化域、人類CD3E活化域、人類CD3G活化域、人類CD28 活化域、人類CD79A活化域、人類DAPIO活化域、人類DAP12 活化域、人類FCER1G活化域、人類CD137 活化域或人類ZAP70 活化域。

[0299]

實施例A7.如實施例 1 或A1 至A6 中之任一者或（除非另外明確敘述）根據本文所提供之任何其他實施例之CAR，進一步包含與胞內活化域相比具有不同胺基酸序列之第一共刺激域、第二共刺激域、第三共刺激域或第四共刺激域。

[0300]

實施例A8.如實施例A7 或（除非另外明確敘述）根據本文所提供之任何其他實施例之CAR，其中第一共刺激域、第二共刺激域、第三共刺激域及/或第四共刺激域包含 4-1BB(CD137)、B7-H3、CD2、CD7、CD27、CD28、用於Lck結合（ICA Δ ）缺失之CD28、ICOS、OX40、BTLA、CD27、CD30、CD40、GITR、HVEM、LFA-1、LIGHT、NKG2C、PD-1、TILR2、TILR4、TILR7、TILR9、Fc受體 γ 鏈、Fc受體 ϵ 鏈、或特異性結合CD83 之配位體之共刺激域。

[0301]

實施例A9.如實施例A7 或（除非另外明確敘述）根據本文所提供之任何其他實施例之CAR，其中第一共刺激域保留共刺激活化性且為人類CD137 共刺激域、人類CD28 共刺激域、人類ICA共刺激域、人類ICOS共刺激域、人類OX40 共刺激域、人類BTLA共刺激域、人類CD27 共刺激域、人類CD30 共刺激域、人類GITR

共刺激域或人類HVEM共刺激域。

[0302]

實施例B1.一種包含反轉錄病毒基因組之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒，該反轉錄病毒基因組包含可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子的一或多個核酸序列，其中該一或多個核酸序列編碼實施例 1 或A1 至A9，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之CAR。

[0303]

實施例B2.一種使用實施例B1 之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒基因方式修飾之經分離重組T細胞或NK細胞。

[0304]

實施例B3.一種使用實施例B1 之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒基因方式修飾之經分離重組T細胞。

[0305]

實施例B4.一種包含實施例B1 之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒及T細胞及/或NK細胞之反應混合物。

[0306]

實施例B5.一種包含實施例B1 之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒及T細胞之反應混合物。

[0307]

實施例C1.一種包含基因組之經分離（例如，重組或經基因方式修飾）之T細胞或NK細胞，該基因組包含可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子的一或多個核酸序列（例如，兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個核酸序列），其中該一或多個（或兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或

六個或更多個) 核酸序列編碼實施例 1 或 A1 至 A8，或 (除非另外明確敘述) 本文所提供之任何其他實施例中之任一者之 CAR。

[0308]

實施例 C2. 一種實施例 C1 之經分離 (例如，重組或經基因方式修飾) 之 T 細胞或 NK 細胞，其中該經分離細胞為 T 細胞。

[0309]

實施例 C3. 一種包含可操作地連接至在 T 細胞及/或 NK 細胞中有活性之啟動子之一或多個核酸序列的經分離 (例如，重組或經基因方式修飾) 之 T 細胞或 NK 細胞，其中該一或多個核酸序列編碼用於結合 Ax1 或 Ror2 之嵌合抗原受體 (CAR)，其包含：

a) 條件活性抗原特異性靶向區 (ASTR)，其相比於 pH 為 7.4，在 pH 為 6.7 下顯示出對 Ax1 或 Ror2 增大的結合力；

b) 跨膜域；及

c) 胞內活化域。

[0310]

實施例 D1. 一種用於使 T 細胞及/或 NK 細胞與目標哺乳動物細胞結合之方法，其包含在低於 7.4 (例如，低於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9，或在 5.8 至 7.0 範圍內，在說明性實施例中，在 6.0 至 6.8 範圍內、在 6.1 至 6.9 範圍內、在 6.2 至 6.8 範圍內，或在範圍之低端在 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5 之間，及在範圍之高端在 6.6、6.7、6.8 及 6.9 之間) 之 pH 下使目標哺乳動物細胞與微環境中之 T 細胞及/或 NK 細胞接觸，其中 T 細胞及/或 NK 細胞表現實施例 1 或 A1 至 A8，或 (除非另外明確敘述) 本文所提供之任何其他實施例中之任一者之 CAR，且目標哺乳動物細胞表現 Ax1 及/或 Ror2。

[0311]

實施例D2.一種用於使T細胞及/或NK細胞與目標哺乳動物細胞結合之方法，其包含在低於 7.4（例如，低於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9，或在 5.8 至 7.0 範圍內，在說明性實施例中，在 6.0 至 6.8 範圍內、在 6.2 至 6.8 範圍內，或在範圍之低端在 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5 之間，及在範圍之高端在 6.6、6.7、6.8 及 6.9 之間）之pH下使目標哺乳動物細胞與微環境中之T細胞及/或NK細胞接觸，其中目標哺乳動物細胞表現Ax1或Ror2，且其中T細胞或NK細胞表現用於分別結合Ax1或Ror2 之嵌合抗原受體（CAR），其中CAR包含：

- a）條件活性抗原特異性靶向區（ASTR），其相比於pH為 7.4，在pH為 6.7 下顯示出對Ax1或Ror2 增大的結合力；
- b）跨膜域；及
- c）胞內活化域。

[0312]

實施例D3.如實施例D1 至D3 中之任一者之方法，其中該結合活化T細胞及/或NK細胞。

[0313]

實施例D4.一種用於活化T細胞或NK細胞之方法，其包含在低於 7.4（例如，低於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9，或在 5.8 至 7.0 範圍內，在說明性實施例中，在 6.0 至 6.8 範圍內、在 6.2 至 6.8 範圍內，或在範圍之低端在 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5 之間，及在範圍之高端在 6.6、6.7、6.8 及 6.9 之間）之pH下使目標哺乳動物細胞與微環境中之T細胞及/或NK細胞接觸，其中目標哺乳動物細胞表現Ax1或Ror2，且其中T細胞或NK細胞表現用於分別結合Ax1或Ror2 之嵌合抗原受體（CAR），其中CAR包含：

a) 條件活性抗原特異性靶向區 (ASTR)，其相比於 pH 為 7.4，在 pH 為 6.7 下顯示出對 Axl 或 Ror2 增大的結合力；

b) 跨膜域；及

c) 胞內活化域。

[0314]

實施例 D5. 如實施例 D5 之方法，其中 CAR 為另一實施例中提供之 CAR 中之任一者。在非限制性說明性實例中，實施例 1 或 A1 至 A8。

[0315]

實施例 D6. 如實施例 D5 之方法，其中 CAR 為實施例 1 或 A1 至 A8 中之任一者中提供之 CAR。

[0316]

實施例 D7. 如實施例 D3 至 D6 中之任一者之方法，其中活化包括細胞介素之經增加表現及/或產生及/或分泌。

[0317]

實施例 D8. 如實施例 D3 至 D7 中之任一者之方法，其中基於活化，T 細胞及/或 NK 細胞增加 IL-2 或 IFN- γ 之表現。

[0318]

實施例 D9. 如實施例 D8 之方法，其中 IL-2 或 IFN- γ 之表現相較於在接觸之前由 T 細胞或 NK 細胞產生之 IL-2 或 IFN- γ 之量增加至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 75%、至少 2 倍、至少 2.5 倍、至少 5 倍、至少 10 倍，或大於 10 倍。

[0319]

實施例 D10. 如實施例 D8 之方法，其中 IL-2 或 IFN- γ 之分泌相較於在接觸之前由 T 細胞或 NK 細胞分泌之 IL-2 或 IFN- γ 之量增

加至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 75%、至少 2 倍、至少 2.5 倍、至少 5 倍、至少 10 倍，或大於 10 倍。

[0320]

實施例D11.如實施例D3 至D7 中之任一者之方法，其中基於活化，T細胞或NK細胞之細胞毒性活性相較於在接觸之前T細胞或NK細胞之細胞毒性活性增加至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 75%、至少 2 倍、至少 2.5 倍、至少 5 倍、至少 10 倍，或大於 10 倍。

[0321]

實施例D12.如實施例D1 至D11 中之任一者之方法，其中目標哺乳動物細胞在T細胞或NK細胞活化之後裂解。

[0322]

實施例D13.如實施例D1 至D12 中之任一者之方法，進一步包含在接觸之前，使用實施例B1 或B2 中之任一者之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導T細胞或NK細胞以經基因方式修飾T細胞或NK細胞以表現CAR。

[0323]

實施例D14.如實施例D13 之方法，其中離體執行轉導。

[0324]

實施例D15.如實施例D1 至D14 中之任一者之方法，進一步包含將微環境之pH增加至為或高於pH為 7.0（例如高於 7.1、7.2 或 7.3），從而降低T細胞或NK細胞之活化。

[0325]

實施例D16.如實施例D1 至D14 中之任一者之方法，進一步包含將微環境之pH增加至為或高於pH為 7.0（例如高於 7.1、7.2

或 7.3)，從而去活化T細胞或NK細胞。

[0326]

實施例D17.如實施例D1至D16中之任一者之方法，其中微環境為腫瘤。

[0327]

實施例D18.如實施例D17之方法，其中腫瘤在人類個體中。

[0328]

實施例D19.如實施例D1至D16中之任一者之方法，其中微環境為體外或離體。

[0329]

實施例E1.一種用於以基因方式修飾淋巴球之方法，其包含使T細胞及/或NK細胞與非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒接觸，該非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒在其基因組中包含聚核苷酸，該聚核苷酸包含可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子的一或多個核酸序列（例如，兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個核酸序列），其中該一或多個（或兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個）核酸序列編碼實施例1或A1至A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體，其中該接觸有利於藉由非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導T細胞及/或NK細胞，從而產生經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞。

[0330]

實施例F1.一種供用於以基因方式修飾淋巴球之方法中之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒，其中該非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒在其基因組中包含聚核苷酸，該聚核苷酸包含

可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子的一或多個核酸序列（例如，兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個核酸序列），其中該一或多個（或兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個）核酸序列編碼實施例 1 或A1 至 A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體，其中該方法包含接觸T細胞及/或NK細胞，且該接觸有利於藉由非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導T細胞及/或NK細胞，從而產生經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞。

[0331]

實施例G1.一種供用於以基因方式修飾T細胞及/或NK細胞以治療腫瘤生長之方法中之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒，其中該方法包含使T細胞及/或NK細胞與非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒接觸，該非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒在其基因組中包含聚核苷酸，該聚核苷酸包含可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子的一或多個核酸序列（例如，兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個核酸序列），其中該一或多個（或兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個）核酸序列編碼實施例 1 或A1 至 A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體，其中該接觸有利於藉由非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導T細胞及/或NK細胞，從而產生經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞。

[0332]

實施例H1.一種非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒在製造用於以基因方式修飾T細胞及/或NK細胞之套組中之用途，其中套組之用途包含使T細胞及/或NK細胞與非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒接觸，該非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒在其基因組中包含聚核苷酸，該聚核苷酸包含可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子的一或多個核酸序列（例如，兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個核酸序列），其中該一或多個（或兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個）核酸序列編碼實施例 1 或A1 至A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體，其中該接觸有利於藉由非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導T細胞及/或NK細胞，從而產生經基因方式修飾之T細胞及/或NK細胞。

[0333]

實施例I1.一種含有非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒及其用途之說明書之商用容器，其中該非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒在其基因組中包含聚核苷酸，該聚核苷酸包含可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子的一或多個核酸序列（例如，兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個核酸序列），其中該一或多個（或兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個）核酸序列編碼實施例 1 或A1 至A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體。

[0334]

實施例I1.一種含有包含非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒及其用途之說明書之容器之套組，其中該等說明書指示用於結合T細胞及/或NK細胞與目標哺乳動物細胞之方法，在該方法中包含：

a) 使用非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導T細胞及/或NK細胞，該非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒在其基因組中包含聚核苷酸，該聚核苷酸包含可操作地連接至在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子之一或多個核酸序列（例如，兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個核酸序列），其中該一或多個（或兩個或更多個、三個或更多個、四個或更多個、五個或更多個或六個或更多個）核酸序列編碼實施例 1 或A1 至A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之CAR；及

b) 在低於 7.4（例如，低於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9，或在 5.8 至 7.0 範圍內，更常見地在 6.0 至 6.8 範圍內、在 6.2 至 6.8 範圍內，或在範圍之低端在 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5 之間，及在範圍之高端在 6.6、6.7、6.8 及 6.9 之間）之pH下使目標哺乳動物細胞與微環境中之經轉導T細胞及/或NK細胞接觸，其中T細胞或NK細胞表現實施例 1 或A1 至A8 中之任一者之CAR，且目標哺乳動物細胞表現Axl或Ror2。

[0335]

實施例K1.一種用於活化T細胞及/或NK細胞之方法，其包含在低於 7.4（例如，低於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9，或在 5.8 至 7.0 範圍內，更常見地在 6.0 至 6.8 範圍內、在 6.2 至 6.8 範圍內，或在範圍之低端在 6.0、

6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5 之間，及在範圍之高端在 6.6、6.7、6.8 及 6.9 之間）之pH下使目標哺乳動物細胞與微環境中之T細胞及/或NK細胞接觸，其中T細胞及/或NK細胞表現實施例 1 或 A1 至 A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體，且目標哺乳動物細胞表現 Ax1 及/或 Ror2。

[0336]

實施例K2.如實施例K1 之方法，進一步包含在接觸之前使用實施例B1 或B2 中之任一者之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導T細胞及/或NK細胞。

[0337]

實施例K3.如實施例K1 之方法，其中在活化之後，T細胞及/或NK細胞誘導細胞介素之表現及/或產生及/或分泌。

[0338]

實施例K4.如實施例K3 之方法，其中細胞介素選自由IL-2 或IFN- γ 組成之群組。

[0339]

實施例L1.一種用於誘導T細胞及/或NK細胞中之細胞介素之表現及/或產生，及/或誘導來自T細胞及/或NK細胞之細胞介素之分泌的方法，其包含在低於 7.4（例如，低於 5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8 或 6.9，或在 5.8 至 7.0 範圍內，更常見地在 6.0 至 6.8 範圍內、在 6.2 至 6.8 範圍內，或在範圍之低端在 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5 之間，及在範圍之高端在 6.6、6.7、6.8 及 6.9 之間）之pH下使目標哺乳動物細胞與微環境中之T細胞及/或NK細胞接觸，其中T細胞及/或NK細胞表現實施例 1 或 A1 至 A8，或（除非另外明確敘述）本文所

提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體，且目標哺乳動物細胞表現Ax1及/或Ror2。

[0340]

實施例L2.如實施例L1 之方法，進一步包含在接觸之前使用實施例B1 或B2 中之任一者之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導T細胞及/或NK細胞。

[0341]

實施例M1.一種編碼嵌合抗原受體之經分離核酸，該嵌合抗原受體用於結合根據實施例 1 或A1 至A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之Ax1或Ror2。

[0342]

實施例M2.如實施例M1 之經分離核酸，其中該核酸進一步包括在T細胞及/或NK細胞中有活性之啟動子，且其中編碼CAR之核酸序列可操作地連接至該啟動子。

[0343]

實施例M3.如實施例M2 之經分離核酸，其中該經分離核酸序列進一步編碼識別域。

[0344]

實施例M4.如實施例M3 之經分離核酸，其中藉由核糖體跳躍序列將編碼識別域之核酸與編碼CAR之核酸分離。

[0345]

實施例M5.如實施例M4 之經分離核酸，其中核糖體跳躍序列為 2A-1。

[0346]

實施例M6.一種非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒，其包含實施例M1 至M5 之核酸中之任一者。

[0347]

實施例M7.如實施例M6 之非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒，其中該非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒為慢病毒顆粒。

[0348]

實施例N1.一種包含編碼根據實施例 1 或A1 至A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體之表現載體，可操作地連接至啟動子。

[0349]

實施例O1.一種感染實施例N1 之表現載體中之任一者之哺乳動物細胞。

[0350]

實施例P1.一種表現實施例 1 或A1 至A8，或（除非另外明確敘述）本文所提供之任何其他實施例中之任一者之嵌合抗原受體之哺乳動物細胞。

[0351]

實施例Q1.一種用於製備條件活性細胞之方法，該條件活性細胞包含用於條件結合Axl或Ror2 之嵌合抗原受體（CAR），其中該方法包含以基因方式修飾具有表現載體之哺乳動物細胞，該表現載體包含可操作地連接至編碼CAR之核苷酸序列的啟動子，其中該CAR包含：

a)顯示在相較於正常生理環境之腫瘤環境及/或體外腫瘤替代物分析條件下活性增加之條件活性抗原特異性靶向區（ASTR），其中ASTR與Axl或Ror2 結合；

b) 跨膜域；及

c) 胞內活化域。

[0352]

實施例 R1. 一種用於治療個體中之癌症之方法，其包含以下步驟：

a)將包含編碼實施例 1 或 A1 至 A8，或(除非另外明確陳述，否則)本文中所提供的任何其他實施例之 CAR 中之任一者之核酸的表現載體引入至自個體獲得之細胞毒性細胞中以產生經基因修飾之細胞毒性細胞；以及

b)對個體投與經基因修飾之細胞毒性細胞。

[0353]

實施例 S1. 一種用於製造包含用於條件性結合 Ax1 或 Ror2 之嵌合抗原受體 (CAR) 之條件性可活化 T 細胞及/或 NK 細胞的離體方法。

a)富集外周血單核細胞 (PBMC) 以自經分離血液分離包含 T 細胞及/或 NK 細胞之 PBMC；

b)在有效條件下，活化經富集之 PBMC 之 T 細胞及/或 NK 細胞；

c)使用不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒轉導經活化之 T 細胞及/或 NK 細胞，由此產生經基因修飾之 T 細胞及/或 NK 細胞，其中該等不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒各自包含逆轉錄基因組，該基因組包含操作性地連接至在 T 細胞及/或 NK 細胞中有活性之啟動子之一或多個核酸序列，其中該等一或多個核酸序列之第一核酸序列編碼實施例 1 或 A1 至 A8，或(除非另外明確陳述，否則)本文中所提供之任何其他實施例之 CAR；以及

d)使經基因修飾之 T 細胞及/或 NK 細胞擴增，由此製造條件性可活化 T 細胞及/或 NK 細胞。

[0354]

實施例 T1. 一種藉由實施例 D3、E1、K2、Q1、R1 或 S1 中

之任一者之方法所產生之經修飾之T細胞。

[0355]

實施例U1. 一種藉由技術方案實施例D3、E1、K2、Q1、R1或S1中之任一者之方法所產生之經修飾之NK細胞。

[0356]

在本文中包括嵌合抗原受體（CAR）之實施例中之任一者中，抗原特異性靶向區（ASTR）可選自抗體、抗原、配位體、配位體之受體結合域、受體、受體之配位體結合域及親和體。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，ASTR可為選自全長抗體、單鏈抗體、Fab片段、Fab'片段、(Fab')₂片段、Fv片段及二價單鏈抗體或雙抗體之抗體。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括來自抗體之重鏈及輕鏈。在本文中包括具有包括抗體之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，抗體可為具有重鏈及輕鏈之單鏈可變片段。在本文中包括具有包括來自抗體之重鏈及輕鏈之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，重鏈及輕鏈可藉由連接子分離，且該連接子可於範圍之低端介於3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸長度之間，且於範圍之高端介於20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175或200個胺基酸長度之間。在一些實施例中，ASTR可為包含重鏈及輕鏈之單鏈可變片段，其中重鏈及輕鏈藉由連接子分離，其中連接子介於6與100個胺基酸長度之間。在本文中包括具有包括單鏈可變片段(包括重鏈及輕鏈)之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，重鏈及輕鏈可藉由連接子分離且連接子可介於6與100個胺基酸長度之間，且ASTR可包括條件活性抗體重鏈或條件活性抗體輕鏈，且其他抗體重鏈或抗體輕鏈可為野生型。

[0357]

在本文中包括具有包括來自抗體之重鏈及輕鏈之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，重鏈可定位於嵌合抗原受體上之輕鏈的N端，或輕鏈可定位於嵌合抗原受體上之重鏈的N端。在本文中包括具有包括來自抗體之重鏈及輕鏈之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，重鏈及輕鏈可來自條件活性抗體。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，CAR可包括雙特異性ASTR。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括條件活性ASTR。在本文中包括具有條件活性ASTR的CAR之實施例中之任一者中，條件活性ASTR可在腫瘤微環境及/或相對於對應生理條件之體外腫瘤替代測試條件中呈現抗原結合的增加，其中腫瘤微環境及/或體外腫瘤替代測試條件可選自由以下各者組成之群組：缺氧、酸性pH、較高濃度之乳酸、較高濃度之透明質酸、較高濃度之白蛋白、較高濃度之腺苷、較高濃度之R-2-羥基戊二酸醛及較低養分有效性。在本文中包括具有條件活性ASTR的CAR之實施例中之任一者中，相比於pH為 7.4，條件活性ASTR可在pH為 6.7 下呈現抗原結合的增加。在本文中包括具有條件活性ASTR的CAR之實施例中之任一者中，相比於pH為 7.4，條件活性ASTR可在pH為 6.0 下（替代在pH為 6.7 下或除在pH為 6.7 下之外）呈現抗原結合的增加。

[0358]

在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，ASTR可與Ax1結合。在本文中包括具有與Ax1結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可結合至Ax1之與包含SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位。

[0359]

在本文中包括具有與Ax1結合，且在說明性實施例中結合至Ax1之包括SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區（具有H1、H2 及H3 序列）之抗體重鏈可變區，其中：a) H1 序列為X₁GX₂TMN(SEQ ID NO:87) ； b) H2 序列為LIKPSNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:88)；且c) H3 序列為GX₃YX₄SYX₅AMDY(SEQ ID NO:89)，其中X₁ 為T或W；X₂ 為H或A；X₃ 為H或D；X₄ 為E或H；且X₅ 為E或F。在本文中包括具有與Ax1結合，且在說明性實施例中結合至Ax1之與包括SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區（具有L1、L2 及L3 序列）之抗體輕鏈可變區，其中：d) L1 序列為KASQDVX₆SAVA(SEQ ID NO:90)；e) L2 序列為WX₇X₈TRX₉T (SEQ ID NO:91)；且f) L3 序列為QEHFSX₁₀PLX₁₁ (SEQ ID NO:92)，其中X₆ 為S或V；X₇ 為A或Q；X₈ 為S或D；X₉ 為H或D；X₁₀ 為T或P；X₁₁ 為T或R。在本文中包括具有與Ax1結合，且在說明性實施例中結合至Ax1之與包括SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區（具有L1、L2 及L3 序列）之抗體重鏈可變區，其中：a) H1 序列為 X₁GX₂X₃MX₄ (SEQ ID NO:134) ； b) H2 序列為 LIKX₅SNGGTX₆YNQKFKG (SEQ ID NO:135)；且c) H3 序列為 GX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄DYX₁₅X₁₆ (SEQ ID NO:136)，其中X₁ 為T、A或W；X₂ 為H或A；X₃ 為T或I；X₄ 為N或I；X₅ 為P或N；X₆ 為S、I或T；X₇ 為H、D、E、P、R或W；X₈ 為Y或N；X₉ 為E、

A、D、F、G、H、I、L、M、N、R、V或Y；X₁₀ 為S、D、M、N或Q；X₁₁ 為Y、C、E或P；X₁₂ 為F、E、N、S、T或V；X₁₃ 為A、D、G、L或Y；X₁₄ 為M、E或F；X₁₅ 為W、A、D、H、L、N、P、R或T；且X₁₆ 為G或H。在本文中包括具有與Ax1結合，且在說明性實施例中結合至Ax1之與包括SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區（具有L1、L2 及L3 序列）之抗體輕鏈可變區，其中：

d) L1 序列為KASQDX₁₇X₁₈SX₁₉VX₂₀（SEQ ID NO:137）；
e) L2 序列為X₂₁X₂₂X₂₃TRX₂₄T（SEQ ID NO:138）；且f) L3 序列為QEX₂₅X₂₆SX₂₇X₂₈X₂₉X₃₀（SEQ ID NO:139），其中X₁₇ 為V、D、G、N或W；X₁₈ 為S或V；X₁₉ 為A、L或M；X₂₀ 為A、N、D或Q；X₂₁ 為W或F；X₂₂ 為A、I、N、P或Q；X₂₃ 為S或D；X₂₄ 為H或D；X₂₅ 為H、C、F、I、L、Q、S、T、V或Y；X₂₆ 為F、C、D、E、G、N或S；X₂₇ 為T、C或P；X₂₈ 為P、A、C、D、E、H、K、S、T、V或W；X₂₉ 為L、G或R；且X₃₀ 為T、I或R。在本文中包括具有與Ax1結合之ASTR的CAR且包括輕鏈可變區之實施例中之任一者中，輕鏈可變區可選自SEQ ID NO:108 至 111。在本文中包括具有與Ax1結合之ASTR的CAR且包括輕鏈可變區之實施例中之任一者中，輕鏈可變區可選自SEQ ID NO:112 至 114。

[0360]

在本文中包括與Ax1結合的CAB-CAR之實施例中之任一者中，重鏈可為輕鏈之N端。在此等實施例中，ASTR可包括SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:129 或SEQ ID NO:159 之胺基酸序列。

[0361]

在本文中包括與Ax1結合的CAB-CAR之實施例中之任一者

中，輕鏈可為重鏈之N端。在此等實施例中，ASTR可包含SEQ ID NO:160 或SEQ ID NO:161 之胺基酸序列。

[0362]

在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，ASTR可與Ror2結合。在本文中包括具有與Ror2結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可結合至Ror2之與包括SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位，且/或ASTR可結合至Ror2之包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之單鏈可變抗體片段與相同的抗原決定位。在本文中包括具有與Ror2結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區之重鏈可變區，該等互補決定區具有H1、H2及H3序列，其中：a) H1序列為GYTX₁TEX₂TX₃H (SEQ ID NO:95) 或X₄GYSITTGYWYWN (SEQ ID NO:96)；b) H2序列為GX₅NX₆NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97) 或YITYDGSKNYNPSLKN (SEQ ID NO:98)；且c) H3序列為GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID NO:99) 或FEGVWX₇GLDY (SEQ ID NO:100)，且X₁為F或E；X₂為Y或D，X₃為M或D；X₄為T或S；X₅為E或I；X₆為T或D；且X₇為Y或G。在本文中包括具有與Ror2結合，且在說明性實施例中作為包括SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之抗體與Ror2之相同抗原決定位結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區之抗體重鏈可變區，該等互補決定區具有H1、H2及H3序列，其中：a) H1序列為GYTX₁TEX₂TX₃H (SEQ ID NO:95)；b) H2序列為GX₅NX₆NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:97)；且c) H3序列為GSLYSYGNSYFDY (SEQ ID

NO:99)，其中X₁為F或E；X₂為Y或D；X₃為M或D；X₅為E或I；且X₆為T或D。在本文中包括具有與Ror2結合，且在說明性實施例中結合至Ror2之與包括SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83之抗體重鏈及SEQ ID NO:84之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區（具有L1、L2及L3序列）之抗體輕鏈可變區，其中：

a) H1序列為X₄GYSITTGYWN（SEQ ID NO:96）；b) H2序列為YITYDGSKNYPNPSLKN（SEQ ID NO:98）；且c) H3序列為FEGVWX₇GLDY（SEQ ID NO:100），其中X₄為T或S；且X₇為Y或G。在本文中包括具有與Ror2結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區之輕鏈可變區，該等互補決定區具有L1、L2及L3序列，其中：

a) L1序列為SATSSX₈SYMH（SEQ ID NO:101）或RASESVDRYGNSFIH（SEQ ID NO:102）；b) L2序列為X₉TSNLAS（SEQ ID NO:103）或RTYNLES（SEQ ID NO:104）；且c) L3序列為QQRSSYPFT（SEQ ID NO:105）或QQTNEDPWT（SEQ ID NO:106），其中X₈為E或V；且X₉為G或H。在本文中包括具有與Ror2結合，且在說明性實施例中結合至Ror2之與包括SEQ ID NO:151之抗體重鏈及SEQ ID NO:152之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區（具有L1、L2及L3序列）之抗體輕鏈可變區，其中：

a) L1序列為SATSSX₈SYMH（SEQ ID NO:101）；b) L2序列為X₉TSNLAS（SEQ ID NO:103）；且c) L3序列為QQRSSYPFT（SEQ ID NO:105），其中X₈為E或V；且X₉為G或H。在本文中包括具有與Ror2結合，且在說明性實施例中結合至Ror2之與包括SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83之抗體重鏈及SEQ ID NO:84之抗體

輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括具有三個互補決定區（具有L1、L2 及L3 序列）之輕鏈可變區，其中：a) L1 序列為RASESVDRYGNSFIH（SEQ ID NO:102）；b) L2 序列為RTYNLES（SEQ ID NO:104）；且c) L3 序列為QQTNEDPWT（SEQ ID NO:106）。

[0363]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括重鏈可變區（包括三個互補決定區），該等互補決定區具有H1、H2 及H3 序列，其中：a) H1 序列為GYTX₁TEX₂X₃X₄H（SEQ ID NO:140）或GYSITTGX₂₉YWN（SEQ ID NO:141）；b) H2 序列為X₅X₆X₇X₈NNGGTGYNQKFKG（SEQ ID NO:142）或YITYDGSX₃₀NYNPSLKN（SEQ ID NO:143）；且c) H3 序列為X₉X₁₀X₁₁SX₁₂YX₁₃YX₁₄X₁₅SYFX₁₆X₁₇X₁₈（SEQ ID NO:144）或CSX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄VX₃₅X₃₆X₃₇LDX₃₈（SEQ ID NO:145），其中X₁為F或E；X₂為Y或D；X₃為T或C；X₄為M、D、E或Y；X₅為G或S；X₆為I或E；X₇為N、C、L或V；X₈為T、D或E；X₉為A、M或T；X₁₀為R或H；X₁₁為G或E；X₁₂為L或F；X₁₃為S或G；X₁₄為G或D；X₁₅為N或E；X₁₆為D或L；X₁₇為Y、C或T；X₁₈為W或L；X₂₉為Y、E、R或T；X₃₀為K或N；X₃₁為R、G、H、W或Y；X₃₂為F、C、N或Q；X₃₃為E或S；X₃₄為G、E、F、H、M、Q或S；X₃₅為W、A、I、P、Q、T或V；X₃₆為Y、G、N或Q；X₃₇為G、S或T；且X₃₈為Y或I。在本文中包括具有與Ror2 結合，且在說明性實施例中結合至Ror2 之與包括SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括抗體重鏈可變區（包括三個互補決定區），該等互補決定區具有H1、

H2 及 H3 序列，其中： a) H1 序列為GYTX₁TEX₂X₃X₄H (SEQ ID NO:140) ； b) H2 序列為X₅X₆X₇X₈NNGGTGYNQKFKG (SEQ ID NO:142) ； 且 c) H3 序 列 為 X₉X₁₀X₁₁SX₁₂YX₁₃YX₁₄X₁₅SYFX₁₆X₁₇X₁₈ (SEQ ID NO:144) ， 其中X₁為F或E；X₂為Y或D；X₃為T或C；X₄為M、D、E或Y；X₅為G或S；X₆為I或E；X₇為N、C、L或V；X₈為T、D或E；X₉為A、M或T；X₁₀為R或H；X₁₁為G或E；X₁₂為L或F；X₁₃為S或G；X₁₄為G或D；X₁₅為N或E；X₁₆為D或L；X₁₇為Y、C或T；且X₁₈為W或L。在本文中包括具有與Ror2 結合，且在說明性實施例中結合至Ror2 之包括SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括重鏈可變區（包括三個互補決定區），該等互補決定區具有H1、H2 及H3 序列，其中： a) H1 序列為GYSITTGX₂₉YWN(SEQ ID NO:141)； b) H2 序列為YITYDGSX₃₀NYNPSLKN (SEQ ID NO:143) ； 且 c) H3 序 列 為 CSX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄VX₃₅X₃₆X₃₇LDX₃₈ (SEQ ID NO:145) ， 其中X₂₉為Y、E、R或T；X₃₀為K或N；X₃₁為R、G、H、W或Y；X₃₂為F、C、N或Q；X₃₃為E或S；X₃₄為G、E、F、H、M、Q或S；X₃₅為W、A、I、P、Q、T或V；X₃₆為Y、G、N或Q；X₃₇為G、S或T；且X₃₈為Y或I。

[0364]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，ASTR可包括輕鏈可變區（包括三個互補決定區），該等互補決定區具有L1、L2 及L3 序列，其中： a) L1 序列為SATSSX₁₉X₂₀X₂₁MX₂₂ (SEQ ID NO:146) 或 RASESVDRYGNSX₃₉IH (SEQ ID NO:147) ； b) L2 序列為

X_{23} TSNLAS (SEQ ID NO:148) 或 X_{40} TYX $_{41}$ LES (SEQ ID NO:149) ; 且 c) L3 序列為 QX $_{24}$ X $_{25}$ SX $_{26}$ YPFX $_{27}$ X $_{28}$ (SEQ ID NO:150) 或 QQX $_{42}$ NX $_{43}$ DPX $_{44}$ TX $_{45}$ (SEQ ID NO:85) , 其中 X_{19} 為 V 或 E ; X_{20} 為 S 或 D ; X_{21} 為 Y 、 C 或 D ; X_{22} 為 H 、 G 或 L ; X_{23} 為 G 、 C 、 H 或 P ; X_{24} 為 Q 或 E ; X_{25} 為 R 或 H ; X_{26} 為 S 、 D 、 G 、 I 、 Q 或 V ; X_{27} 為 T 或 D ; X_{28} 為 F 、 D 或 E ; X_{39} 為 F 、 S 或 T ; X_{40} 為 R 、 C 、 D 、 E 或 W ; X_{41} 為 N 或 D ; X_{42} 為 T 、 I 或 P ; X_{43} 為 E 或 V ; X_{44} 為 W 或 T ; 且 X_{45} 為 F 或 T 。在本文中包括具有與 Ror2 結合 , 且在說明性實施例中結合至 Ror2 之與包括 SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及 SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位結合之 ASTR 的 CAR 之實施例中之任一者中 , ASTR 可包括抗體輕鏈可變區 (包括三個互補決定區) , 該等互補決定區具有 L1 、 L2 及 L3 序列 , 其中 : a) L1 序列為 SATSSX $_{19}$ X $_{20}$ X $_{21}$ MX $_{22}$ (SEQ ID NO:146) ; b) L2 序列為 X_{23} TSNLAS (SEQ ID NO:148) ; 且 c) L3 序列為 QX $_{24}$ X $_{25}$ SX $_{26}$ YPFX $_{27}$ X $_{28}$ (SEQ ID NO:150) , 其中 X_{19} 為 V 或 E ; X_{20} 為 S 或 D ; X_{21} 為 Y 、 C 或 D ; X_{22} 為 H 、 G 或 L ; X_{23} 為 G 、 C 、 H 或 P ; X_{24} 為 Q 或 E ; X_{25} 為 R 或 H ; X_{26} 為 S 、 D 、 G 、 I 、 Q 或 V ; X_{27} 為 T 或 D ; 且 X_{28} 為 F 、 D 或 E 。在本文中包括具有與 Ror2 結合 , 且在說明性實施例中結合至 Ror2 之與包括 SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及 SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之 ASTR 的 CAR 之實施例中之任一者中 , ASTR 可包括輕鏈可變區 (包括三個互補決定區) , 該等互補決定區具有 L1 、 L2 及 L3 序列 , 其中 : a) the L1 sequence is RASESVDRYGNSX $_{39}$ IH (SEQ ID NO:147); b) the L2 sequence is X_{40} TYX $_{41}$ LES (SEQ ID NO:149); and c) the L3 sequence is QQX $_{42}$ NX $_{43}$ DPX $_{44}$ TX $_{45}$ (SEQ ID NO:85), wherein X_{39} is F, S, or T ;

X₄₀ is R, C, D, E, or W; X₄₁ is N or D; X₄₂ is T, I, or P; X₄₃ is E or V; X₄₄ is W or T; and X₄₅ is F or T.

[0365]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包含SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:120 或SEQ ID NO:121 之胺基酸序列。

[0366]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR作為包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體與Ror2 之相同抗原決定位結合之說明性實施例中，重鏈可變區可包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83.320 之胺基酸序列。如技術方案2931 之嵌合抗原受體，其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位，且其中輕鏈可變區包含SEQ ID NO:86 之胺基酸序列。

[0367]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包含SEQ ID NO:84 之胺基酸序列。

[0368]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包含SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:120 或SEQ ID NO:121 之胺基酸序列。

[0369]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之胺基酸序列。

[0370]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:82 或SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包含SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:131 或SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:157 或SEQ ID NO:158 之胺基酸序列。

[0371]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，輕鏈可變區可包含SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124 或SEQ ID NO:152

之胺基酸序列。

[0372]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包含SEQ ID NO:152 之胺基酸序列。

[0373]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，輕鏈可變區可包含SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119 或SEQ ID:151 之胺基酸序列。

[0374]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之抗體相同抗原決定位之說明性實施例中，重鏈可變區可包含SEQ ID:151 之胺基酸序列。

[0375]

在本文中包括具有與Ror2 結合之ASTR的CAR之實施例中之任一者中，在其中ASTR結合至Ror2 之與包含SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包含SEQ ID NO:155 或SEQ ID NO:156 之胺基酸序列。

[0376]

在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，跨膜域可與SEQ ID NO:46 之序列具有至少 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD8 跨膜域（例如SEQ ID NO:47 或 75）具有至少 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD4 跨膜域（例如SEQ ID NO:48）具有至少 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD3 ζ （zeta）跨膜域（例如SEQ ID NO:49）具有至少 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD28 跨膜域（例如SEQ ID NO:50 或 76）具有至少 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與OX40 跨膜域（例如SEQ ID NO:51）具有至少 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD134 跨膜域具有至少 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，或與CD7 跨膜域（例如SEQ ID NO:52）具有至少 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，且條件活性ASTR可在腫瘤微環境及/或相對於在ASTR為CAR之部分時的相應生理條件之體外腫瘤測試條件下保持與Ror2 或Axl增加的結合。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，跨膜可為CD8 跨膜域或CD28 跨膜域。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，跨膜域可定位於ASTR與胞內活化域之間。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，胞內活化域可保持一活化活性且與CD3Z活化域（例如SEQ ID NO:11 至

16) 具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD3D活化域（例如SEQ ID NO:17 至 19）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD3E活化域（例如SEQ ID NO:20 至 21）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD3G活化域（例如SEQ ID NO:22 至 23）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD28 活化域（例如SEQ ID NO:35）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD79A活化域（例如SEQ ID NO:24 至 26）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與DAP10 活化域（例如SEQ ID NO:34）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與DAP12 活化域（例如SEQ ID NO:27 至 31）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與FCER1G活化域(SEQ ID NO:32 至 33) 具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD137 活化域具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，或與ZAP70 活化域（例如SEQ ID NO:36）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性。

[0377]

在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，CAR可進一步包括柄域。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，CAR可進一步包括共刺激域。在一些實施例中，CAR可包括柄域及共刺激域。在一些實施例中，CAR可包括自胺基末端至羧基末端、ASTR、柄域、跨膜域、共刺激域及胞內活化域。

[0378]

在本文中包括具有柄域的CAR之實施例中之任一者中，柄域可與此項技術中已知的任何CD8 柄域（例如SEQ ID NO:125）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，或與任何CD28 柄域（例如SEQ ID NO:126）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，且條件活性抗體特異性靶向區可在腫瘤微環境及/或相對於在ASTR為CAR之部分時的對應生理條件之體外腫瘤替代測試條件下保持與Ror2 或Axl增加的結合。

[0379]

在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，CAR可進一步包括共刺激域。在本文中包括具有共刺激域的CAR之實施例中之任一者中，胞內共刺激域可包括DAP10/CD28 型訊號傳導鏈或免疫受體酪胺酸基活化基元（ITAM）之胞內訊號傳導多肽。在本文中包括具有共刺激域的CAR之實施例中之任一者中，CAR可包括具有不同於胞內活化域的胺基酸序列之共刺激域。在本文中包括具有共刺激域的CAR之實施例中之任一者中，共刺激域可與CD137 共刺激域（例如SEQ ID NO:1）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD28 共刺激域（例如SEQ ID

NO:2) 具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與ICA共刺激域（例如SEQ ID NO:3）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與ICOS共刺激域（例如SEQ ID NO:4）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與OX40 共刺激域（例如SEQ ID NO:5）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與BTLA 共刺激域（例如SEQ ID NO:6）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD27 共刺激域（例如SEQ ID NO:7）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與CD30 共刺激域（例如SEQ ID NO:8）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，與GITR 共刺激域（例如SEQ ID NO:9）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性，或與HVEM共刺激域（例如SEQ ID NO:10）具有至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列一致性。在本文中包括具有共刺激域的CAR之實施例中之任一者中，共刺激域可為CD28 共刺激域或CD137 共刺激域。在本文中包括具有共刺激域的CAR之實施例中之任一者中，共刺激域可為ICA共刺激域。在本文中包括具有共刺激域的CAR之實施例中之任一者中，共刺激域可為ICA共刺激域且胞內活化域可為CD3Z活化域。在本文中包括具有柄域及

共刺激域的CAR之實施例中之任一者中，柄域可為CD8 柄域或CD28 柄域，跨膜域可為CD8 跨膜域或CD28 跨膜域，胞內活化域可為CD3Z活化域，且共刺激域可為CD137 共刺激域、ICA共刺激域，或CD28 共刺激域，或共刺激域可包括CD137 共刺激域及ICA共刺激域兩者。

[0380]

在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，CAR可進一步包括識別域。在包括具有識別域的CAR之實施例中之任一者中，識別域可在相同於CAR之多肽上表現。在包括具有位於相同於CAR之多肽上之識別域的CAR之實施例中之任一者中，識別域可位於N端處或接近N端，諸如位於N端之 10、20、30、40 或 50 個胺基酸內。在包括具有位於相同於CAR之多肽上之識別域的CAR之實施例中之任一者中，識別域可位於N端處或接近C端，諸如位於C端之 10、20、30、40 或 50 個胺基酸內。在包括具有位於相同於CAR之多肽上之識別域的CAR之實施例中之任一者中，識別域可在CAR之結構域中之任一者之間，諸如在柄域與跨膜域之間。在本文中包括具有識別域的CAR之實施例中之任一者中，識別域可經表現以使其共價地附接至CAR，且識別域可藉由裂解訊號或核糖體跳躍序列與CAR分離。在本文中包括具有識別域（具有核糖體跳躍序列）的CAR之實施例中之任一者中，核糖體跳躍序列可為 2A-1，例如SEQ ID NO:77。在本文中包括具有識別域的CAR之實施例中之任一者中，識別域可為至少 10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 個EGFR之連續胺基酸。在包括具有識別域的CAR之實施例中之任一者中，識別域可為FLAG抗原決定位（SEQ ID NO:38）。

[0381]

在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，CAR可進一步包括訊號序列。在本文中包括具有訊號序列的CAR之實施例中之任一者中，訊號序列可為抗原決定位標記、親和域及/或產生偵測訊號之多肽。在本文中包括具有訊號序列的CAR之實施例中之任一者中，訊號序列可位於胺基末端處。

[0382]

在本文中包括表現載體（包括編碼CAR之核酸）之實施例中之任一者中，表現載體可進一步包括編碼識別域之核苷酸。在本文中包括表現載體（包括編碼CAR之核酸及編碼識別域之核苷酸）之實施例中之任一者中，編碼識別域之核苷酸可編碼EGFR之至少10、15、20、25、30、35、40、45或50個連續胺基酸。在本文中包括表現載體（包括編碼CAR之核酸及編碼識別域之核苷酸）之實施例中之任一者中，編碼識別域之核苷酸可藉由內部核糖體進入位點與編碼CAR之核苷酸分離。在本文中包括表現載體（包括編碼CAR之核酸及編碼識別域之核苷酸）之實施例中之任一者中，識別域可表現為進一步包括CAR之單個核苷酸之部分，且位於單個多肽上之識別域可藉由裂解訊號或核糖體跳躍序列與CAR分離，該核糖體跳躍序列可為2A-1序列，例如SEQ ID NO:77。在本文中包括表現載體之實施例中之任一者中，表現載體可為病毒載體。在本文中包括是病毒載體的表現載體之實施例中之任一者中，病毒載體可為不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒、不可複製型重組慢病毒顆粒、痘苗病毒、脊髓灰質炎病毒、腺伴隨病毒、SV40、單純疱疹病毒、伽馬逆轉錄病毒、人類免疫缺陷病毒、慢病毒或腺病毒。

[0383]

在本文中包括表現CAR之哺乳動物細胞之實施例中之任一

者中，該細胞可為淋巴細胞。在本文中包括表現CAR之淋巴細胞之實施例中之任一者中，淋巴細胞可為T細胞。在本文中包括表現CAR之T細胞之實施例中之任一者中，T細胞可為CD4+細胞或T細胞可為CD8+T細胞。在本文中包括表現CAR之淋巴細胞之實施例中之任一者中，淋巴細胞可為在腫瘤微環境中優先殺死抗原表現細胞之細胞毒性細胞，且該淋巴細胞可包括編碼實施例 1 或 A1 至 A8 之 CAR 中之任一者的核酸。

[0384]

在本文中包括含有容器（含有不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒）之套組及其用途的指示之實施例中之任一者中，該等指示可進一步包括在藉由以充足的量將pH調節藥用試劑引入至微環境之後升高微環境之pH，藉此影響靶向哺乳動物細胞與T細胞及/或NK細胞之結合。在本文中包括含有容器（含有不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒）之套組及其用途的指示之實施例中之任一者中，套組可進一步包括pH調節藥用試劑。在本文中包括含有容器（含有不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒）之套組及其用途的指示之實施例中之任一者中，該等指示可包括在接觸之前將能夠表現CAR的T細胞及/或NK細胞引入至個體中之步驟，其中在引入之後，包括編碼CAR之一或多個核酸序列之T細胞及/或NK細胞表現CAR且與在個體中表現同源抗原之靶向哺乳動物細胞結合。

[0385]

在本文中包括治療癌症之實施例中之任一者中，癌症可為腎細胞癌。在本文中包括治療癌症之實施例中之任一者中，癌症可為軟組織肉瘤癌或間皮瘤癌。在本文中包括治療癌症且包括具有識別域的CAR之實施例中之任一者中，方法可進一步包

括在向個體投與基因基因改造細胞之後投與針對識別域之一劑量的抗體。在本文中包括治療癌症之實施例中之任一者中，癌症可表現Ax1且CAR可包括結合Ax1之ASTR。在本文中包括治療癌症之實施例中之任一者中，癌症可表現Ror2 且CAR可包括結合Ror2 之ASTR。在本文中包括治療癌症之實施例中之任一者中，細胞毒性細胞可為T細胞及/或NK細胞。在本文中包括治療癌症之實施例中之任一者中，細胞毒性細胞可為T細胞。在本文中包括使T細胞及/或NK細胞擴增之實施例中之任一者中，方法可進一步包括在擴增之後收集經基因修飾之T細胞及/或NK細胞。在本文中包括收集T細胞及/或NK細胞之實施例中之任一者中，方法可進一步包括將所收集的經基因修飾之T細胞及/或NK細胞低溫保藏。在本文中包括將T細胞及/或NK細胞低溫保藏之實施例中之任一者中，可將經低溫保藏的經基因修飾之T細胞及NK細胞解凍。在本文中包括收集T細胞及/或NK細胞之實施例中之任一者中，方法可進一步包括將所收集的經基因修飾之T細胞及/或NK細胞引入至個體中。

[0386]

相比於pH7.4，在pH 6.7 下具有與Ax1增加的結合之例示性條件活性CAR（CAB-CAR）見本文中之實例 1 中。在說明性實施例中，CAR或ASTR可結合至Ax1之與包含SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗體輕鏈的單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位。在此類說明性實施例之其他實施例中，抗Ax1 CAR或ASTR包含或為單鏈可變片段（scFv）。在其他說明性實施例中，抗Ax1 scFv包含重鏈（其為輕鏈之N端）或輕鏈（其為重鏈之N端）。在本文中包括CAR之實施例中之任一者中，且在結合至Ax1之與包含SEQ ID NO:79 之抗體重鏈及SEQ ID NO:80 之抗

體輕鏈之抗體相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR可包括SEQ ID NO:128、129、159、160 或 161 中之任一者。此外，本文中之實施例中之任一者的抗Ax1 CAR可包括本文中所提供之CAR組分中之任一者。在某些例示性實施例中，抗Ax1 CAR可包括表 1 中所列之CAR組分且可為表 1 中之CAR中之任一者。更典型地，對於本文中包括抗Ax1 CAR之任何實施例，CAR為CAB-CAR，且在非限制性說明性實施例中可包括（例如）CAR-CAR組分中之任一者及表 1 中所提供之顯現細胞毒性活性的CAB-CAR。舉例而言，抗Ax1 CAB-CAR可包括CD8 單肽、CD8 或CD28 柄/跨膜域、CD137、ICΔ，或ICΔ共刺激域及CD137 共刺激域兩者，及/或CD3Z活化域。此外，用於本文中包括抗Ax1 CAR（且尤其地抗Ax1 CAB-CAR）的實施例中之任一者之說明性CAR在非限制性說明性實施例中包括表 1 中顯現條件性細胞毒性活性之抗Ax1 CAB-CAR中之任一者。此類說明性CAB-CAR包括表 1 之F1-2-1、F1-2-2、F1-2-3、F1-2-6、F1-2-8、F1-2-10、F1-2-13、F1-2-14、F1-2-15、F1-2-22 或F1-2-23。在本文中包括ASTR之實施例中之任一者中，ASTR可包括F1-2-1、F1-2-2、F1-2-3、F1-2-6、F1-2-8、F1-2-10、F1-2-13、F1-2-14、F1-2-15、F1-2-22 或F1-2-23 之ASTR。此外，用於本文中包括抗Ax1 CAR（且尤其地抗Ax1 CAB-CAR）的實施例中之任一者之說明性CAR在非限制性說明性實施例中包括表 1 中顯現高條件性細胞毒性活性之抗Ax1 CAB-CAR。此類說明性CAB-CAR包括F1-2-13、F1-2-15、F1-2-22 或F1-2-23。相應地，在本文中包括ASTR之實施例中之任一者中，ASTR可包括F1-2-1、F1-2-2、F1-2-3、F1-2-6、F1-2-8、F1-2-10、F1-2-13、F1-2-14、F1-2-15、F1-2-22 或F1-2-23 之ASTR。

[0387]

相比於 pH 7.4，在 pH 6.7 下具有與 Ror2 增加的結合之例示性條件活性 CAR（CAB-CAR）見於本文中之實例 1 中。在說明性實施例中，CAR 或 ASTR 可結合至 Ror2 之與包含 SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及 SEQ ID NO:84 之抗體輕鏈之單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位，或 CAR 或 ASTR 可結合至 Ror2 之與包含 SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及 SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位。在此類說明性實施例之其他實施例中，抗 Ror2 CAR 或 ASTR 包含或為單鏈可變片段（scFv），且在其他說明性實施例中包含輕鏈（其為重鏈之 N 端）或包含重鏈（其為輕鏈之 N 端）。在本文中包括 CAR 或 ASTR 之實施例中之任一者中，且在結合至 Ror2 之與包含 SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:83 之抗體重鏈及 SEQ ID NO:84 之單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位，或可結合至 Ror2 之與包含 SEQ ID NO:151 之抗體重鏈及 SEQ ID NO:152 之抗體輕鏈之單鏈可變抗體片段相同的抗原決定位之說明性實施例中，ASTR 可包括 SEQ ID NO:130 至 132 或 153 至 158 中之任一者。此外，本文中之實施例中之任一者的抗 Ror2 CAR 可包括本文中所提供之 CAR 組分中之任一者。在某些例示性實施例中，抗 Ror2 CAR 可包括表 2 中所列之 CAR 組分且可為表 2 中之 CAR 中之任一者。更典型地，對於本文中包括抗 Ror2 CAR 之任何實施例，CAR 為 CAB-CAR，且在非限制性說明性實施例中可包括（例如）CAR-CAR 組分中之任一者及表 2 中所提供之展現細胞毒性活性的 CAB-CAR。舉例而言，抗 Ror2 CAB-CAR 可包括 CD8 單肽、CD8 或 CD28 柄/跨膜域、CD137、共刺激域及/或 CD3Z 活化域。此外，用於本文中包括抗 Ror2 CAR（且尤其地抗 Ror2 CAB-CAR）

的實施例中之任一者之說明性CAR在非限制性說明性實施例中包括表 2 中展現條件性細胞毒性活性之抗Ror2 CAB-CAR中之任一者。此類說明性CAB-CAR包括F1-1-9、F1-1-10、F1-1-11、F1-1-12、F1-1-15、F1-1-17、F1-1-18、F1-1-19、F1-1-20、F1-1-21、F1-1-23、F1-1-25 或F1-1-26。在本文中包括抗Ror2 ASTR之實施例中之任一者中，ASTR可包括表 2 之F1-1-9、F1-1-10、F1-1-11、F1-1-12、F1-1-15、F1-1-17、F1-1-18、F1-1-19、F1-1-20、F1-1-21、F1-1-23、F1-1-25 或F1-1-26 之ASTR。此外，用於本文中包括抗Ror2 CAR（且尤其地抗Ror2 CAB-CAR）的實施例中之任一者之說明性CAR在非限制性說明性實施例中包括表 2 中展現高條件性細胞毒性活性之抗Ror2 CAB-CAR中之任一者。此類說明性CAB-CAR包括F1-1-11、F1-1-12、F1-1-15、F1-1-17、F1-1-19、F1-1-20 或F1-1-23。相應地，在本文中包括抗Ror2 ASTR之實施例中之任一者中，ASTR可包括F1-1-11、F1-1-12、F1-1-15、F1-1-17、F1-1-19、F1-1-20、F1-1-23 之ASTR。

[0388]

在另一態樣中，本文中提供一種用於調節表現條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之T細胞及/或NK細胞與表現個體中之CAB-CAR之同源抗原之細胞結合的方法，該方法包括：

a. 將包括編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞引入至個體中，其中在引入之後，包括編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR且與表現個體中之同源抗原之細胞結合，且其中同源抗原為Axl多肽或其抗原決定位，或Ror2多肽或其抗原決定位；以及

b. 以充足量將藥用試劑投與至個體以升高血液pH及/或組織之pH及/或微環境之pH，其中該投與在引入之前、期間或之後執

行，且其中血液、組織及/或微環境之升高的pH調節表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與表現具有升高的pH之血液、組織或微環境中之同源抗原之細胞的結合。

[0389]

在另一態樣中，本文中提供一種用於減輕個體中之目標上腫瘤外毒性的方法，其包括：

a·將編碼條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之核酸引入至個體之T細胞或NK細胞中以產生包括編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞；

b·將包括編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞引入至個體中，其中在引入之後，包括編碼CAB-CAR之核酸的T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR且與表現個體中之同源抗原之細胞結合，其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2多肽或其抗原決定位；以及

以充足量將藥用試劑投與至個體以升高血液pH及/或組織之pH及/或微環境之pH以介導CAB-CAR與其具有升高的pH之血液、組織及/或微環境中之同源抗原之結合，藉此減輕個體中之目標上腫瘤外細胞毒性。

[0390]

在一些實施例中，核酸可為載體。在說明性實施例中，載體為逆轉錄病毒載體。

[0391]

在另一態樣中，本文中提供一種用於控制T細胞及/或NK細胞與靶向哺乳動物細胞之結合的方法，其包括：

a·使目標哺乳動物細胞與微環境中之T細胞及/或NK細胞接觸，其中目標哺乳動物細胞表現同源抗原，且如相比於pH 7.4，

T細胞及/或NK細胞在pH 6.7 下表現與同源抗原有差異地結合之條件活性生物嵌合抗原受體 (CAB-CAR)；其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位；以及

b. 藉由以充足量將藥用試劑引入至微環境來升高微環境之pH，藉此控制T細胞及/或NK細胞與靶向哺乳動物細胞之結合。

[0392]

在另一態樣中，本文中提供一種用於控制表現條件活性生物嵌合抗原受體 (CAB-CAR) 之T細胞及/或NK細胞與個體中之目標哺乳動物細胞在活體內之結合的方法，該方法包括經由升高個體內之微環境之pH的有效劑量方案向個體投與pH調節藥用試劑，其中個體包括表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞，其中如相比於pH 7.4，CAB-CAR在pH 6.7 下與其同源抗原有差異地結合其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位，其中微環境包括目標哺乳動物細胞，其中目標哺乳動物細胞在其表面上表現同源抗原，且其中T細胞及/或NK細胞在升高微環境之pH之前相比於之後與靶向哺乳動物細胞有差異地結合，藉此控制T細胞及/或NK細胞與個體中之靶向哺乳動物細胞在活體內之結合。

[0393]

在包括藥用試劑及CAB-CAR的緊接上文所提供之態樣中之任一者中，CAB-CAR可在一個pH下比在不同pH下具有與其同源抗原之降低的結合。在針對CAB-CAR之差異性結合之說明性pH值未曾提供於最廣泛態樣中之說明性實施例中及替代地對於替代用於此類態樣之彼等值的其他實施例，CAB-CAR可在較高pH下比在較低pH下具有降低的結合。舉例而言，CAB-CAR可在高於pH為 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5 下比在低於pH為 6.4、6.5、

6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 下具有與其同源抗原之降低的結合。在其他實施例中，CAB-CAR可在較高pH下比在較低pH下具有降低的結合。舉例而言，CAB-CAR可在低於pH為 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 下比在高於pH為 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5 下具有與其同源抗原之降低的結合。在一些說明性實施例中，相比於pH 7.4 至 7.6，CAB-CAR在pH為 6.5 至 6.7 下呈現增加的結合。在其他說明性實施例中，相比於pH為 7.4，CAB-CAR在pH為 6.7 下呈現增加的結合。在其他實施例中，相比於血液之pH，CAB-CAR在腫瘤之pH下呈現增加的結合。在一些實施例中，CAB-CAR可包括抗原特異性靶向區、柄域及胞內活化域。在一些實施例中，CAB-CAR亦可包括共刺激域。在一些實施例中，CAB-CAR可與腫瘤相關之抗原結合。

[0394]

在包括藥用試劑及CAB-CAR之緊接上文所提供之態樣中之任一者中，pH為微環境可自低於pH為 7.0 升高至高於pH為 7.0。舉例而言，pH可自低於pH為 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 升高至高於pH為 7.0、7.1、7.2、7.3 或 7.4。在一些實施例中，CAB-CAR可在引入藥用試劑之前在升高的pH下而pH為非微環境下與同源抗原結合。在某些實施例中，pH可自低於pH為 7.0 升高至 7.1 至 8.0、或至pH為 7.1 至 7.8、或至pH為 7.2 至 7.8、或至pH為 7.2 至 7.6、或至pH為 7.3 至 7.6、或至pH為 7.4 至 7.8、或至pH為 7.4 至 7.6。視投與之藥用試劑之類型及劑量而定，此pH之升高可發生少於 1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、12 小時或 24 小時，或多於 1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、12 小時或 24 小時。在某些實施例中，投與藥用試劑以使得pH在目標組織（諸如腫瘤）中，及例如在目標組織（例如腫

瘤)微環境之至少一個表面中，在目標組織(例如腫瘤)微環境之至少部分中以及在說明性實施例中在整個目標組織(例如腫瘤)微環境中維持高於 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5；或在 7.0、7.1、7.2、7.3 之範圍的低端與 7.4、7.5、7.6、7.7 或 7.8 之範圍的高端之間。

[0395]

在包括藥用試劑及CAB-CAR之緊接上文所提供之態樣中之任一者中，微環境可為活體內微環境，諸如腫瘤、組織、非腫瘤組織、正常組織或已經歷pH瞬時變化之組織。舉例而言，典型地經歷pH瞬時變化之組織包括厭氧條件中之肌肉組織或經歷鍛煉之肌肉組織或已發炎組織或正經歷發炎之組織。在包括目標哺乳動物細胞之一些實施例中，目標哺乳動物細胞可為腫瘤細胞或非腫瘤細胞或正常細胞。

[0396]

在包括藥用試劑及CAB-CAR之緊接上文所提供之態樣中之任一者中，藥用試劑可為碳酸氫鈉、參(羥甲基)胺基甲烷、碳酸氫鈉及碳酸鈉之等莫耳高滲溶液，或質子泵抑制劑，該等質子泵抑制劑諸如艾美拉唑(esomeprazole)、艾美拉唑及萘普生(naproxen)、蘭索拉唑(lansoprazole)、奧美拉唑(omeprazole)及雷貝拉唑(rabeprazole)。

[0397]

在包括方法中之不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒(包括CAB-CAR及藥用試劑)之緊接上文所提供之任何實施例中，包括可操作地連接至在編碼CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞中具有活性之啟動子之轉錄單元的聚核苷酸由T細胞及/或NK細胞吸收，以使得此類細胞能夠表現CAB-CAR。在說明性實施例中，

T細胞及/或NK細胞將聚核苷酸整合至其基因組中。

[0398]

在包括方法中之不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒（包括CAB-CAR及藥用試劑）之緊接上文所提供之任何實施例中，不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒可在其表面上包括生物批准之單株抗體之識別域。舉例而言，識別域可包括由識別EGFR或其抗原決定位之抗體所識別之多肽。

[0399]

在另一態樣中，本文中提供一種pH調節藥用試劑以供在用於控制T細胞及/或NK細胞與個體中之目標哺乳動物細胞在活體內之結合的方法中使用，該方法包括經由升高個體內之微環境之pH的有效劑量方案向個體投與pH調節藥用試劑，其中個體包括T細胞及/或NK細胞，其中如相比於pH 7.4，T細胞及/或NK細胞在pH 6.7 下表現與其同源抗原有所差異地結合之條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR），其中同源抗原為Axl多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位，其中T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR，其中微環境包括目標哺乳動物細胞，其中目標哺乳動物細胞在其表面上表現同源抗原，且其中T細胞及/或NK細胞在藉由投與pH調節藥用試劑升高微環境之pH之前相比於之後有與目標哺乳動物細胞有所差異地結合，藉此控制T細胞及/或NK細胞與個體中之目標哺乳動物細胞在活體內之結合。

[0400]

在另一態樣中，本文中提供一種藥用試劑以供在用於調節表現條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之T細胞或NK細胞與表現個體中之CAB-CAR之同源抗原之細胞之結合的方法中使用，以用於治療腫瘤生長，其中該方法包括：

a · 將能夠表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞引入至個體中，其中同源抗原為Axl多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位，其中CAB-CAR與表現個體中之同源抗原之細胞結合，其中在引入之後，包括編碼CAB-CAR之核酸之T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR且與表現個體中之同源抗原之細胞結合；以及

b · 以有效量向個體投與藥用試劑以升高血液pH及/或組織pH及/或微環境pH以調節表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與表現具有升高的pH之血液、組織或微環境中之同源抗原之細胞之結合。

[0401]

在另一態樣中，本文中提供一種藥用試劑以供在用於減輕個體中之目標上腫瘤外毒性之方法中使用，其中該方法包括：

a · 將編碼條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之核酸引入至個體之T細胞或NK細胞中以產生能夠表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞；

b · 將能夠表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞引入至個體中，其中在引入之後，包括編碼CAB-CAR之核酸之T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR且與表現個體中之同源抗原之細胞結合；以及

c · 以充足量向個體投與藥用試劑以升高血液pH及/或組織pH及/或微環境pH以調節CAB-CAR與具有升高的pH之血液、組織及/或微環境中之其同源抗原之結合，其中同源抗原為Axl多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位，藉此減輕個體中之目標上腫瘤外毒性。

[0402]

在另一態樣中，本文中提供一種藥用試劑以供在用於控制表現條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之T細胞及/或NK細胞與目標哺乳動物細胞之結合的方法中使用，以用於治療腫瘤生長，其中該方法包括：

a．使目標哺乳動物細胞與微環境中的表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞接觸，其中目標哺乳動物細胞表現同源抗原，其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位，且其中如相比於pH 7.4，T細胞及/或NK細胞在pH 6.7 下表現與同源抗原有差異地結合之條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）；以及

b．藉由以充足量將藥用試劑引入至微環境來升高微環境之pH，藉此控制表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞與目標哺乳動物細胞之結合。

[0403]

在另一態樣中，本文中提供一種藥用試劑以供在用於控制表現條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之T細胞及/或NK細胞與個體中的目標哺乳動物細胞在活體內之結合之方法中使用，以用於治療腫瘤生長，其中該藥用試劑為pH調節藥用試劑，且其中該方法包括經由升高個體內之微環境之pH的有效劑量方案向個體投與pH調節藥用試劑，其中個體包括表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞，其中如相比於pH 7.4，CAB-CAR在pH 6.7 下與其同源抗原有差異地結合，其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位，其中微環境包括目標哺乳動物細胞，其中目標哺乳動物細胞在其表面上表現同源抗原，且其中T細胞及/或NK細胞在升高微環境之pH之前相比於之後與目標哺乳動物細胞有差異地結合。

[0404]

在另一態樣中，本文中提供一種藥用試劑以供在用於控制表現條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之T細胞及/或NK細胞與個體中的目標哺乳動物細胞在活體內之結合之方法中使用，以用於治療腫瘤生長，且其中該方法包括經由升高個體內之微環境之pH的有效劑量方案向個體投與pH調節藥用試劑，其中個體包括表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞，其中如相比於pH 7.4，CAB-CAR在pH 6.7 下與其同源抗原有差異地結合，其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位，其中微環境包括目標哺乳動物細胞，其中目標哺乳動物細胞在其表面上表現同源抗原，且其中T細胞及/或NK細胞藉由投與pH調節藥用試劑在升高微環境之pH之前相比於之後與目標哺乳動物細胞有差異地結合。

[0405]

在另一態樣中，本文中提供一種藥用試劑以供在用於控制表現條件活性生物嵌合抗原受體（CAB-CAR）之T細胞及/或NK細胞與個體中的目標哺乳動物細胞在活體內之結合的藥物之製造中使用，其中pH調節藥用試劑將經由升高個體內之微環境之pH之有效劑量方案向個體投與，其中個體包括表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞，其中如相比於pH 7.4，CAB-CAR在pH 6.7 下與其同源抗原有差異地結合，其中同源抗原為Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2 多肽或其抗原決定位，其中微環境包括目標哺乳動物細胞，其中目標哺乳動物細胞在其表面上表現同源抗原，且其中T細胞藉由投與pH調節藥用試劑在升高微環境之pH之前相比於之後與目標哺乳動物細胞有差異地結合。

[0406]

在包括 pH 調節藥用試劑或供用於方法中之藥用試劑及 CAB-CAR 或包括 pH 調節藥用試劑及 CAB-CAR 之使用之緊接上文所提供的態樣中之任一者中，CAB-CAR 可在一個 pH 下比在不同 pH 下具有與其同源抗原之降低的結合。在針對 CAB-CAR 之差異性結合之說明性 pH 值未曾提供於最廣泛態樣中之說明性實施例中及替代地對於替代用於此類態樣之彼等值的其他實施例，CAB-CAR 可在較高 pH 下比在較低 pH 下具有降低的結合。舉例而言，CAB-CAR 可在高於 pH 為 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5 下比在低於 pH 為 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 下具有與其同源抗原之降低的結合。在其他實施例中，CAB-CAR 可在較高 pH 下比在較低 pH 下具有降低的結合。舉例而言，CAB-CAR 可在低於 pH 為 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 下比在高於 pH 為 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5 下具有與其同源抗原之降低的結合。在一些說明性實施例中，相比於 pH 7.4 至 7.6，CAB-CAR 在 6.5 至 6.7 之 pH 下呈現增加的結合。在其他說明性實施例中，相比於 pH 為 7.4，CAB-CAR 在 pH 為 6.7 下呈現增加的結合。在其他實施例中，相比於血液之 pH，CAB-CAR 在腫瘤之 pH 下呈現增加的結合。在一些實施例中，CAB-CAR 可包括抗原特異性靶向區、柄域及胞內活化域。在一些實施例中，CAB-CAR 亦可包括共刺激域。在一些實施例中，CAB-CAR 可與腫瘤相關之抗原結合。

[0407]

在包括 pH 調節藥用試劑或供用於方法中之藥用試劑及 CAB-CAR 或包括 pH 調節藥用試劑及 CAB-CAR 之使用之緊接上文所提供的態樣中之任一者中，微環境之 pH 可自低於 pH 為 7.0 升高至高於 pH 為 7.0。舉例而言，pH 可自低於 pH 為 6.4、6.5、

6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 升高至高於 pH 為 7.0、7.1、7.2、7.3 或 7.4。在一些實施例中，CAB-CAR 可在引入藥用試劑之前在升高的 pH 下而非 pH 為微環境下與同源抗原結合。在某些實施例中，pH 可自低於 pH 為 7.0 升高至 7.1 至 8.0、或至 pH 為 7.1 至 7.8、或至 pH 為 7.2 至 7.8、或至 pH 為 7.2 至 7.6、或至 pH 為 7.3 至 7.6、或至 pH 為 7.4 至 7.8、或至 pH 為 7.4 至 7.6。視投與之藥用試劑之類型及劑量而定，此 pH 之升高可發生少於 1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、12 小時或 24 小時，或多於 1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、12 小時或 24 小時。在某些實施例中，投與藥用試劑以使得 pH 在目標組織（諸如腫瘤）中，及例如在目標組織（例如腫瘤）微環境之至少一個表面中，在目標組織（例如腫瘤）微環境之至少部分中以及在說明性實施例中在整個目標組織（例如腫瘤）微環境中維持高於 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5；或在 7.0、7.1、7.2、7.3 之範圍的低端與 7.4、7.5、7.6、7.7 或 7.8 之範圍的高端之間。

[0408]

在包括 pH 調節藥用試劑或供用於方法中之藥用試劑及 CAB-CAR 或包括 pH 調節藥用試劑及 CAB-CAR 之使用的緊隨上文所提供之態樣中之任一者中，其中同源抗原為 Ax1 多肽或其抗原決定位，或 Ror2 多肽或其抗原決定位，微環境可為活體內微環境，諸如腫瘤、組織、非腫瘤組織、正常組織或已經歷 pH 瞬時變化之組織。舉例而言，典型地經歷 pH 瞬時變化之組織包括厭氧條件中之肌肉組織或經歷鍛煉之肌肉組織或已發炎組織或正經歷發炎之組織。在包括目標哺乳動物細胞之一些實施例中，目標哺乳動物細胞可為腫瘤細胞或非腫瘤細胞或正常細胞。

[0409]

在包括 pH 調節藥用試劑或供用於方法中之藥用試劑及 CAB-CAR 或包括 pH 調節藥用試劑及 CAB-CAR 之使用之緊接上文提供的態樣中之任一者中，其中同源抗原為 Ax1 多肽或其抗原決定位，或 Ror2 多肽或其抗原決定位，藥用試劑可為碳酸氫鈉、參（羥甲基）胺基甲烷、碳酸氫鈉及碳酸鈉之等莫耳高滲溶液，或質子泵抑制劑，該等質子泵抑制劑諸如艾美拉唑、艾美拉唑及萘普生、蘭索拉唑、奧美拉唑及雷貝拉唑。

[0410]

在包括 pH 調節藥用試劑或供用於方法中之藥用試劑及 CAB-CAR 或包括 pH 調節藥用試劑及 CAB-CAR 之使用的緊隨上文所提供之態樣中之任一者中，其中同源抗原為 Ax1 多肽或其抗原決定位，或 Ror2 多肽或其抗原決定位，藥用試劑可用在用於治療癌症、腫瘤、腫瘤生長或細胞增殖性疾病之方法中使用。

[0411]

在另一態樣中，本文中提供一種含有容器（含有不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒）及其供用於治療腫瘤生長的指示之套組，其中該等指示指示用於控制 T 細胞及/或 NK 細胞與靶向目標動物細胞之結合之方法，在該方法中包括：

a · 使用在其基因組中包括相比於 pH 7.4，在 pH 6.7 下與同源抗原有差異地結合之條件活性生物嵌合抗原受體 (CAB-CAR) 之不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒轉導 T 細胞及/或 NK 細胞，從而產生能夠表現 CAB-CAR 之 T 細胞及或 NK 細胞，其中同源抗原為 Ax1 多肽或其抗原決定位，或 Ror2 多肽或其抗原決定位；

b · 將能夠表現 CAB-CAR 之 T 細胞及/或 NK 細胞引入至個體中，其中在引入之後，包括編碼 CAB-CAR 之核酸之 T 細胞及/或 NK 細胞表現 CAB-CAR 且與表現個體中之同源抗原之細胞結合；

c. 使目標哺乳動物細胞與微環境中之表現CAB-CAR之T細胞及/或NK細胞接觸，其中目標哺乳動物細胞表現CAB-CAR之同源抗原，且T細胞及/或NK細胞表現CAB-CAR；以及

藉由以充足量將pH調節藥用試劑引入至微環境來升高微環境之pH，藉此影響靶向哺乳動物細胞與T細胞及/或NK細胞之結合。

在一些實施例中，套組可進一步包括pH調節藥用試劑。

[0412]

在套組之一些實施例中，CAB-CAR可在一個pH比在不同pH下具有與Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2多肽或其抗原決定位降低之結合。在針對CAB-CAR之差異性結合之說明性pH值未曾提供於最廣泛態樣中之說明性實施例中及替代地對於替代用於此類態樣之彼等值的其他實施例，CAB-CAR可在較高pH下比在較低pH下具有降低的結合。舉例而言，CAB-CAR可在高於pH為7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5下比在低於pH為6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0下具有與其同源抗原之降低的結合。在其他實施例中，CAB-CAR可在較高pH下比在較低pH下具有降低的結合。舉例而言，CAB-CAR可在低於pH為6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0下比在高於pH為7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5下具有與其同源抗原之降低的結合。在一些說明性實施例中，相比於pH 7.4至7.6，CAB-CAR在pH為6.5至6.7下呈現增加的結合。在其他說明性實施例中，相比於7.4之pH，CAB-CAR在pH為6.7下呈現增加的結合。在其他實施例中，相比於pH為血液，CAB-CAR在pH為腫瘤下呈現增加的結合。在一些實施例中，CAB-CAR可包括抗原特異性靶向區、柄域及胞內活化域。在一些實施例中，CAB-CAR亦可包括共刺激域。在一些實施例

中，CAB-CAR可與腫瘤相關之抗原結合。

[0413]

在套組之一些實施例中，微環境之pH可自低於pH為 7.0 增加至高於pH為 7.0。舉例而言，pH可自低於pH為 6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 升高至高於pH為 7.0、7.1、7.2、7.3 或 7.4。在一些實施例中，CAB-CAR可在引入藥用試劑之前在升高的pH下而非pH為微環境下與同源抗原結合。在某些實施例中，pH可自低於pH為 7.0 升高至 7.1 至 8.0、或至pH為 7.1 至 7.8、或至pH為 7.2 至 7.8、或至pH為 7.2 至 7.6、或至pH為 7.3 至 7.6、或至pH為 7.4 至 7.8、或至pH為 7.4 至 7.6。視投與之藥用試劑之類型及劑量而定，此pH之升高可發生少於 1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、12 小時或 24 小時，或多於 1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、8 小時、12 小時或 24 小時。在某些實施例中，投與藥用試劑以使得pH在目標組織（諸如腫瘤）中，及例如在目標組織（例如腫瘤）微環境之至少一個表面中，在目標組織（例如腫瘤）微環境之至少部分中以及在說明性實施例中在整個目標組織（例如腫瘤）微環境中維持高於 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5；或在 7.0、7.1、7.2、7.3 之範圍的低端與 7.4、7.5、7.6、7.7 或 7.8 之範圍的高端之間。在一些實施例中，微環境可為活體內微環境，諸如腫瘤、組織、非腫瘤組織、正常組織或已經歷pH瞬時變化之組織。舉例而言，典型地經歷pH瞬時變化之組織包括厭氧條件中之肌肉組織或經歷鍛煉之肌肉組織或已發炎組織或正經歷發炎之組織。在包括目標哺乳動物細胞之一些實施例中，靶向哺乳動物細胞可為腫瘤細胞或非腫瘤細胞或正常細胞。

[0414]

在套組之一些實施例中，藥用試劑可為碳酸氫鈉、參（羥甲基）胺基甲烷、碳酸氫鈉及碳酸鈉之等莫耳高滲溶液或質子泵抑制劑，該等質子泵抑制劑諸如艾美拉唑、艾美拉唑及蔡普生、蘭索拉唑、奧美拉唑及雷貝拉唑。

[0415]

如上文所揭示，與CAB-CAR結合之同源抗原可為Ax1多肽或其抗原決定位或Ror2多肽或其抗原決定位。在一些實施例中，同源抗原可為與Ax1多肽或其抗原決定位之至少10、15、20個或所有胺基酸之分支或與Ror2多肽或其抗原決定位具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列一致性之多肽。如本文中所揭示，能夠與Ax1多肽或其抗原決定位，或Ror2多肽或其抗原決定位結合之CAB-CAR在pH為6.7下而非pH為7.4下以較高結合親和性典型地結合其同源抗原。

[0416]

技術者將認識到，當說明書指代「Ax1 CAB」或「Ax1 CAB-CAR」時，「Ax1」是指識別Ax1或其抗原決定位之ASTR。類似地，技術者將認識到，當說明書指代「Ror2 CAB」或「Ror2 CAB-CAR」時，「Ror2」是指識別Ror2或其抗原決定位之ASTR。

[0417]

本文中所使用之任何部分標題是僅出於組織的目的且並不視作以任何方式限制所描述之主題物。

實例

[0418]

提出以下實例以便為一般熟習此項技術者提供如何做出及使用本發明之完整揭示及描述，且並不意欲限制發明者視為其

發明之範疇，其亦不意欲表示以下實驗為所有或僅經執行之實驗。已努力確保關於所使用數字（例如量、溫度等）之準確度，但應計入一些實驗性誤差及偏差。除非另有指示，否則份數為重量份數，分子量為重量平均分子量，溫度以攝氏度計，且壓力在大氣壓下或接近大氣壓。可使用標準縮寫，例如bp，鹼基對；kb，千鹼基；pl，皮升；s或sec，秒；min，分鐘；h或hr，小時；aa，胺基酸；kb，千鹼基；bp，鹼基對；nt，核苷酸；i.m.，胞內（地）；i.p.，腹膜內（地）；s.c.，皮下（地）；i.v.，靜脈內（地）；及其類似縮寫。

實例 1： 用於靶向AXL及ROR2 之嵌合抗原受體之產生及分析

[0419]

此實例展現用於製造及使用本發明之實施例的條件活性CAR之方法。編碼靶向Axl及Ror2 之條件活性ASTR之核酸經獲得且用於產生編碼條件活性CAR之慢病毒表現載體。使用含有此等表現載體之慢病毒轉導T細胞，且在針對靶細胞之各種體外腫瘤替代測試中測試經轉導之細胞。

表現條件活性CAR之慢病毒表現載體之產生。

[0420]

獲得編碼靶向Axl(含有SEQ ID NO:79 及 80 之scFv構建體)之條件活性ASTR的核酸及編碼靶向Ror2(含有SEQ ID NO:83 及 84 之scFv構建體、含有SEQ ID NO:82 及 84 之scFv構建體及含有SEQ ID NO:151 及 152 之scFv構建體)之條件活性ASTR之3 個核酸。本文中之詳細描述提供用於製備條件活性ASTR(有時稱作條件活性生物製劑(CAB))之方法，包括用於藉由演化且選擇用於製備所獲得之CAB之抗體片段來製造CAB之方

法。做出對序列之較小修飾，包括優化人類細胞中之表現的密碼子及去除剪接供體及受體位點。單鏈抗體之重鏈（SEQ ID NO:79、83 及 82）及單鏈抗體之輕鏈（SEQ ID NO:80 及 84）由不同長度之連接子（SEQ ID NO: 53、54 及 55）相連，且使用其他域併入至慢病毒表現載體中以製備表 1 及表 2 中所列之候選CAR。

慢病毒之產生

[0421]

慢病毒是藉由使 293T細胞（Lenti-X 293T，Clontech）與慢病毒表現載體瞬時轉染來產生。細胞藉由在Freestyle 293 表現培養基（Thermo Fisher Scientific）中連續生長來適應懸浮液培養。使用溶解於弱酸中之PEI（Polysciences）轉染懸浮液中之細胞。細胞（30 mL）在 125 mL Erlenmeyer燒瓶中生長至 1×10^6 個細胞/毫升。

[0422]

對於 30 mL細胞，將質粒DNA稀釋於 1.5 ml Opti-MEM培養基中。總DNA（1 $\mu\text{g/mL}$ 培養體積）為具有以下莫耳比之 4 種質粒之混合物。2 $\times$ 基因組質粒、1 $\times$ 含Rev之質粒、1 $\times$ 含VSVg之質粒及 1 $\times$ 含Gagpol之質粒。分別地，在 1.5 ml Opti-MEM中稀釋PEI至 2 $\mu\text{g/mL}$ （培養體積，與DNA之 2:1 比率）。在 5 分鐘室溫培育之後，將兩種溶液充分混合在一起，且在室溫下培育 20 分鐘以上。將最終體積（3 ml）添加至細胞。隨後伴隨呈 120 rpm 及具有 5%至 8% CO_2 之旋轉在 37 $^\circ\text{C}$ 下培育細胞 72 小時。

[0423]

在 72 小時後，藉由以 1,000g離心 10 分鐘來收集上清液。將上清液倒入新鮮試管且添加PEG溶液（PEG-IT，System

Biosciences) 中之 $\frac{1}{4}$ 上清液體積。藉由在 4°C 下培育整夜來沈澱不病毒，接著在 4°C 下以 1,500 g 離心 20 分鐘。去除上清液，且將病毒再懸浮於 1:100 體積之 Ex-Vivo15 培養基中。藉由 HT1080 細胞上之 GFP 或藉由 Jurkat 細胞上之 TAG 表現來滴定病毒。

Axl 及 Ror2 之 T 細胞轉導/擴增

[0424]

在用於 T 細胞轉導及擴增之初始方法中，Pan-T 細胞自 All 細胞 (Allcells, PB009-1F) 獲得。如上文所論述來製備抗 Axl CAB-CAR 及抗 ROR2 CAB-CAR 不可複製型重組逆轉錄病毒顆粒。在慢病毒轉導前兩天，將細胞解凍且在由 X-VIVO15 (Lonza #04-418Q)、5% 人類 AB 血清 (Valley Biomedical Inc., #HP1022) 及 10 mM N-乙醯基 L 半胱氨酸 (Sigma-Aldrich #A9165) 組成之人類 T 細胞培養基中培養。添加重組人類 IL-2 (R&D 202-IL-010) 直至 100 IU/mL 之最終濃度。在慢病毒轉導前二十四小時，將原代人類 T 細胞以 0.5×10^6 個細胞/孔接種至 12 孔盤中且在 1:3 細胞:珠粒比率下使用 Dynabeads 人類 T-活化子 CD3/CD28 (Thermo #11131D) 來活化。在轉導當天，以 MOI 5 之 Axl 及 20 MOI 之 Ror2 將慢病毒顆粒溶液添加至孔。使經轉導之 T 細胞以約 10^6 個/mL 於人類 T 細胞培養基中維持 3 天，隨後轉移至具有含 IL-2 之 30 mL/孔之人類 T 細胞培養基的 6 孔 G-Rex 中。在實驗進行之前，培養細胞至少 10 天且每隔一天添加 IL-2。

[0425]

執行具有稍作修改之轉導及擴增條件之某些改進型實驗。其中指示 (替代來自 AllCell 之 Pan T 細胞)，根據製造商之說明書，T 細胞藉由使用 Ficoll-Paque PREMIUM® (GE Healthcare Life Sciences) 之密度梯度離心自血沈棕黃層 (San Diego Blood

Bank)，隨後溶解紅血細胞。為研究人類腎臟細胞系Caki-1 及 HEK293 之條件性CAR依賴性殺死，在擴增之前，使用EasySep 人類CD56 陽性篩選套組II（幹細胞技術#17855）將CD56+細胞自經轉導之Pan T細胞（AllCell）中去除。

eTAG表現之FACS分析

[0426]

在轉導之後第八天，收集經轉導之初級T細胞（ 0.5×10^6 ），洗滌且於FACS緩衝液（PBS+2% FBS+0.1%疊氮化鈉）中再懸浮。使用 100 μ L 之含 0.9 μ g/ml 之生物素化西妥昔單抗（biotinylated-cetuximab）（Promab）之FACS緩衝液於冰上對細胞染色 30min。將經染色之細胞使用FACS緩衝液洗滌且使用Streptavidin PE（eBioscience，12-4317-87，0.2 mg/ml）、CD3-BV421（Biolegend，317344）、CD4-PE-Dazzle 594（Biolegend，300548）及CD8-BV570（Biolegend，301038）於冰上染色 30min。將細胞於FACS緩衝液中洗滌兩次，以FACS緩衝液與BD Cytofix（BD #554655）之 1:1 混合物固定，使用Novocyte（ACEA）處理，且使用NovoExpress軟體（ACEA）分析所得資料。

即時細胞殺死測試

[0427]

經轉導之T細胞的細胞毒性活性藉由xCELLigence系統（ACEA）來量測。簡言之，經轉導之初級T細胞（效應細胞）如上文來產生，冷凍保存，解凍且於含有 100 IU/ML之IL-2 之人類T細胞培養基中靜置 2 天。包括CHO細胞（ATCC）及CHO細胞之靶細胞經穩定轉染以表現人類Ax1（CHO-Ax1）或ROR2（CHO-ROR2）或在其他實驗中表現分別由Ax1及ROR2 之FACS

測試為陽性之人類腎癌細胞系Caki-1（源）及HEK293（Lenti-X 293T，Clontech）。在實驗之前，在pH 6.7 及pH 7.4 下或以 0.1 pH增量在自pH 6.3 至pH 7.4 之pH之範圍下，使用含有 40 mM HEPES及PIPES之人類T細胞培養基以每天 20K個細胞/孔將靶細胞接種至E-盤。在測試當天，以 3:1、1:1 且在一些情形中 0.3:1 之效應細胞/靶細胞比率（E/T）將經靜置之效應細胞添加至實驗孔中。在添加效應細胞之後每 5 分鐘進行阻抗讀取持續大約 40 小時且阻抗報告為細胞指數（CI）。如下計算特異性細胞溶解之百分比：
$$\frac{((CI_{\text{靶向}} + \text{經對照病毒轉導之效應T細胞}) - (CI_{\text{靶向}} + \text{使用針對Ax1或Ror2 之CAR轉導之效應T細胞}))}{(CI_{\text{靶向}} + \text{經對照病毒轉導之效應T細胞})} \times 100。$$

結果

[0428]

相比於正常組織（有時在本文中稱為（CAB-CAR）），藉由將條件活性單鏈抗體之重鏈及輕鏈併入至慢病毒表現載體中連同其他CAR域及eTag域一起來製造用於在降低腫瘤環境之pH下結合具有增加的活性之Ax1或Ror2 之嵌合抗原受體（CAR）。經製造及測試之野生型對照CARS及條件活性（CAB）CAR包括如表 1（Ax1）及表 2（Ror2）中與提供於表 3 中之進一步詳細序列資訊一起所指示之不同CAR模組/組分的各種組合。自胺基至羧基末端之模組之各種組合於表 1 及表 2 中指示。此等模組包括CD8 訊號序列肽（「sp」）（P1）（SEQ ID NO:74）；Ax1 CAB VH（SEQ ID NO:79）、Ax1 CAB VL（SEQ ID NO:80）、Ax1 VH（SEQ ID NO:93）、Ax1 VL（SEQ ID NO:94）、Ror2 VH（SEQ ID NO:107）、Ror2 VL（SEQ ID NO:84）、Ror2 CAB VL（SEQ ID NO:152）、Ror2 CAB1 VH(SEQ ID NO:82)、Ror2 CAB2

VH (SEQ ID NO:83)、Ror2 CAB3 VH (SEQ ID NO:151) (P2) 及(P4)；連接子 1 (SEQ ID NO:53)、連接子 2 (SEQ ID NO:54) 或連接子 3 (SEQ ID NO:55) (P3)；來自CD8 (SEQ ID NO:75) 或CD28 (SEQ ID NO:76) (P5)之柄/鉸鏈及跨膜域；來自CD137 (SEQ ID NO:1)、CD28 (SEQ ID NO:2)、ICΔ (SEQ ID NO:3) 或ICΔ及CD137 (SEQ ID NO:133) (P6)兩者之共刺激域；來自CD3Z (SEQ ID NO:13) (P7)之活化域；2A-1 核糖體跳躍序列 (SEQ ID NO:77) (P8)；eTAG (SEQ ID NO:78) (P9)。

[0429]

使用表現表 1 及表 2 之候選CAR之重組慢病毒顆粒轉導初級T細胞，且經轉染之細胞的百分比藉由使用FACS測定表現eTag之細胞之百分比來測定。使用編碼如圖 1 中之代表性Ax1 CAR所顯示之候選CAR之重組慢病毒顆粒成功轉導初級T細胞。

[0430]

在pH為 7.4 (生理學pH) 或pH為 6.7 (替代腫瘤測試條件) 下，分析針對表現Ax1或Ror2 之靶細胞之候選CAR細胞毒性活性。如在下文更詳細地解釋，在pH為 6.7 而非pH為 7.4 下，許多候選CAR在使靶細胞溶解時更有效。CAB活性並未於包括完全野生型重鏈及輕鏈 (亦即在生理條件下鑒定且尚未進一步演化之VH鏈及VL鏈兩者) 之對照CAR中偵測。

[0431]

在涉及Ax1之某些初始實驗中，使用第一條件活性重鏈及第一條件活性輕鏈 (兩者均分別自野生型重鏈及輕鏈演化) 來測試十八種抗Ax1 CAB-CAR (F1-2-1 至F1-2-18)。如表 1 中所顯示，經初始測試之十八種抗AXL CAB-CAR中之九種具有可偵測細胞毒性活性 (於表中指示為「CAB活性」)。無經測試之僅

具有野生型 ASTR 抗體重鏈及輕鏈之 CAB-CAR 具有條件性活性（於表 1 中鑒定為「Ax1 VH」及「Ax1 VL」（F1-2-19、F1-2-20））。在使用上文所提供之相同轉導及增殖條件之改進型實驗中，包括不同共刺激域之抗 Ax1 CAB-CAR 呈現條件性細胞毒性活性（F1-2-22 及 F1-2-23）。

[0432]

在涉及 Ror2 之某些初始實驗中，分析針對兩個不同抗原決定位之條件活性 ASTR。相對於針對抗原決定位 1（F1-1-9 至 F1-1-24）之 Ror2 CAB-CAR，經初始測試之十六種抗 Ror2 CAB-CAR 中之十一種具有條件性細胞毒性活性（表 2）。相對於針對抗原決定位 2 之 Ror2 CAB-CAR，於初始實驗中呈現殺死活性之六種抗 Ror2 CAB-CAR 中之兩種（F1-1-25 及 F1-1-26）具有條件性細胞毒性活性（表 2）。無經測試之僅具有野生型 ASTR 抗體重鏈及輕鏈之 CAB-CAR 於此等殺死測試（於表 2 中鑒定為「Ror2 VH」及「Ror2 VL」（F1-1-1 至 F1-1-8））中具有條件性活性。

[0433]

總體而言，許多候選 CAB-CAR 在 pH 為 6.7 下比在 pH 為 7.4 下對靶細胞具有更高細胞毒性活性。在 pH 為 6.7 而非 pH 為 7.4 下，在溶解靶細胞時更有效之例示性 CAB-CAR 包括 CAB-CAR F1-2-3（包括抗 Ax1 ASTR（SEQ ID NO:159））、CAB-CAR F1-2-8（包括抗 Ax1 ASTR（SEQ ID NO:160））、CAB-CAR F1-2-10（包括抗 Ax1 ASTR（SEQ ID NO:161））、CAB-CAR F1-2-13（包括抗 Ax1 ASTR（SEQ ID NO:129））、CAB-CAR F1-2-15（包括抗 Ax1 ASTR（SEQ ID NO:128））、CAB-CAR F1-1-9（包括抗 Ror2 ASTR（SEQ ID NO:157））、CAB-CAR F-1-11（包括

抗Ror2 ASTR (SEQ ID NO:153))、CAB-CAR F-1-15 (包括抗Ror2 ASTR (SEQ ID NO:132))、CAB-CAR F-1-17 (包括抗Ror2 ASTR (SEQ ID NO:154))、CAB-CAR F-1-19 (包括抗Ror2 ASTR (SEQ ID NO:130))、CAB-CAR F1-1-21 (包括抗Ror2 ASTR (SEQ ID NO:158))、CAB-CAR F1-1-23 (包括抗Ror2 ASTR (SEQ ID NO:131))、CAB-CAR F-1-25 (包括抗Ror2 ASTR (SEQ ID NO:155))及CAB-CAR F-1-26 (包括抗Ror2 ASTR (SEQ ID NO:156))。ASTR全部包括在生理條件下鑒定且進一步演化之VH或VL之至少一個模組。

[0434]

圖 2B至圖 2F顯示針對Axl (對具有非條件活性之野生型ASTR之對照CAR) 之更佳條件活性之CAB-CAR中之一些之CHO-Axl腫瘤隨時間之代表性體外殺死 (圖 2A)。圖 2A及圖 2B中使用 3:1 的效應細胞與靶細胞之比率。圖 2C至圖 2F中使用 1:1 的效應細胞與靶細胞之比率。圖 3B至圖 2J顯示以 3:1 的效應細胞與靶細胞之比率針對Ror2 (對具有非條件活性之野生型ASTR之對照CAR) 之更佳條件活性之CAB-CAR中之一些之CHO-Ror2 腫瘤隨時間之代表性體外殺死 (圖 3A)。

[0435]

隨時間以 0.1 pH之pH (pH滴定) 增量在自pH為 7.4 至 6.的範圍下分析候選CAR中之一些之條件性活性。如圖 4A中之CAB-CAR F1-2-13(AXL)及圖 5A中之CAB-CAR F1-1-15(Ror2) 之代表性曲線中所顯示, 經測試之包括條件活性ASTR (CAB-CAR) 的候選CAR中之全部 (針對Axl及Ror2 中之每一者的 5 種CAB-CAR) 展現表現其同源抗原的CHO細胞之pH依賴性殺死, 其在生理pH下較低且在培養液變為更偏酸性時增加。

圖 4B展現藉由CAB-CAR F1-2-13 之pH依賴性殺死自pH7.4 升高至pH7.0，且同樣地自pH 7.0 至pH 6.5 較高。圖 5B顯示藉由CAB-CAR F1-1-15 之pH依賴性殺死自pH 7.4 逐漸升高至pH 6.6。

[0436]

在無此等蛋白之轉基因表現之情況下，候選CAB-CAR之條件性殺死亦在表現Axl及Ror2 之內生性含量之人類腎臟細胞上測試。圖 6A顯示表現Axl之Caki-1 細胞藉由表現F1-2-15 之T細胞之條件性殺死。圖 6B顯示表現Ror2 之HEK293 細胞藉由表現F1-1-15 之T細胞之條件性殺死。

[0437]

因此，本文中所提供之方法在製備及鑒定針對展現條件性殺死(當在體外於T細胞上表現時)的Axl及Ror2 之條件活性CAR時為有效的。

表 1.表現不同抗Axl CAR之T細胞之即時細胞分析結果。

ID	模組									CA B活 性
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
F1-2 -1	CD8 sp	Axl CAB VH	連接 子 1	Axl CAB VL	CD 8	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-2 -2	CD8 sp	Axl CAB VH	連接 子 1	Axl CAB VL	CD 28	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-2 -3	CD8 sp	Axl CAB VH	連接 子 2	Axl CAB VL	CD 8	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-2 -4	CD8 sp	Axl CAB VH	連接 子 2	Axl CAB VL	CD 28	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -5	CD8 sp	Axl CAB VH	連接 子 3	Axl CAB VL	CD 8	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -6	CD8 sp	Axl CAB	連接 子 3	Axl CAB	CD 28	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等

		VH		VL						
F1-2 -7	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 1	Axl CAB VH	CD 8	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -8	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 1	Axl CAB VH	CD 28	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-2 -9	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 2	Axl CAB VH	CD 8	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -10	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 2	Axl CAB VH	CD 28	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-2 -11	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 3	Axl CAB VH	CD 8	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -12	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 3	Axl CAB VH	CD 28	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -13	CD8 sp	Axl CAB VH	連接 子 1	Axl CAB VL	CD 28	ICA	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-2 -14	CD8 sp	Axl CAB VH	連接 子 2	Axl CAB VL	CD 28	ICA	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-2 -15	CD8 sp	Axl CAB VH	連接 子 3	Axl CAB VL	CD 28	ICA	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-2 -16	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 1	Axl CAB VH	CD 28	ICA	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -17	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 2	Axl CAB VH	CD 28	ICA	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -18	CD8 sp	Axl CAB VL	連接 子 3	Axl CAB VH	CD 28	ICA	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -19	CD8 sp	Axl VH	連接 子 3	Axl VL	CD 8	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -20	CD8 sp	Axl VH	連接 子 3	Axl VL	CD 28	CD13 7	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-2 -21	CD8 sp	Axl VH	連接 子 3	Axl VL	CD 28	ICA	CD 3Z	2A -1	eTA G	無

F1-2 -22	CD8 sp	Ax1 CAB VH	連接 子 3	Ax1 CAB VL	CD 28	ICΔC D137	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-2 -23	CD8 sp	Ax1 CAB VH	連接 子 3	Ax1 CAB VL	CD 28	CD28	CD 3Z	2A -1	eTA G	高

表 2.表現不同抗 Ror2 CAR之T細胞之即時細胞分析結果。

ID	模組									CA B活 性
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
F1-1 -1	CD8 sp	Ror2 VH	連接 子 1	Ror2 VL	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -2	CD8 sp	Ror2 VH	連接 子 1	Ror2 VL	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -3	CD8 sp	Ror2 VH	連接 子 2	Ror2 VL	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -4	CD8 sp	Ror2 VH	連接 子 2	Ror2 VL	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -5	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 1	Ror2 VH	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -6	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 1	Ror2 VH	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -7	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 2	Ror2 VH	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -8	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 2	Ror2 VH	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -9	CD8 sp	Ror2 CAB1 VH	連接 子 1	Ror2 VL	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-1 -10	CD8 sp	Ror2 CAB1 VH	連接 子 1	Ror2 VL	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-1 -11	CD8 sp	Ror2 CAB1 VH	連接 子 2	Ror2 VL	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-1 -12	CD8 sp	Ror2 CAB1 VH	連接 子 2	Ror2 VL	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-1 -13	CD8 sp	Ror2 VL	Link er 1	Ror2 CAB1	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無

				VH						
F1-1 -14	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 1	Ror2 CAB1 VH	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -15	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 2	Ror2 CAB1 VH	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-1 -16	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 2	Ror2 CAB1 VH	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -17	CD8 sp	Ror2 CAB2 VH	連接 子 1	Ror2 VL	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-1 -18	CD8 sp	Ror2 CAB2 VH	連接 子 1	Ror2 VL	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-1 -19	CD8 sp	Ror2 CAB2 VH	連接 子 2	Ror2 VL	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-1 -20	CD8 sp	Ror2 CAB2 VH	連接 子 2	Ror2 VL	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-1 -21	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 1	Ror2 CAB2 VH	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-1 -22	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 1	Ror2 CAB2 VH	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -23	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 2	Ror2 CAB2 VH	CD 8	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	高
F1-1 -24	CD8 sp	Ror2 VL	連接 子 2	Ror2 CAB2 VH	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	無
F1-1 -25	CD8 sp	Ror2 CAB VL	連接 子 1	Ror2 CAB3 VH	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等
F1-1 -26	CD8 sp	Ror2 CAB VL	連接 子 2	Ror2 CAB3 VH	CD 28	CD 137	CD 3Z	2A -1	eTA G	中等

實例 2： 表現eTAG之靶細胞之消除

西妥昔單抗濃度對消除之影響

[0438]

藉由Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, 45-001-751) 自來自健康供體之ACD外周血分離PBMC。為製備靶細胞，使用含有可操作地連接至啟動子的GFP及eTag之寫碼區之慢病毒轉導PBMC，從而表現GFP螢光蛋白及eTag靶向物。將經活化且擴增同時未經轉導之PBMC用作非靶向對照細胞。將經擴增之靶細胞及非靶向對照細胞儲存於液氮中之冷凍培養基中直至使用。使用 10 ng/mL huGM-CSF (R&D Systems, 215-GM-010) 預刺激來自相同供體之新鮮分離之PBMC整夜且用作效應細胞。允許靶細胞及非靶細胞自冷凍保藏中再生一天，且隨後在使用之前使用CT-Violet標記非靶向對照細胞。將靶細胞及非靶細胞以 1:1 比率混合，且隨後在不同濃度之西妥昔單抗或同種型對照抗體之情況下，於U形底 96 孔盤中以 50:1 效應細胞:靶細胞比率使用效應PBMC共培養。在培養 22 小時之後，將樣本以 400g離心 5 分鐘。使經粒化細胞再懸浮於FACS洗滌緩衝液 (PBS+2%FBS+0.1%疊氮化鈉) 中，且在流式細胞計量之前使用等體積之BD Cytfix (BD #554655) 固定。僅含有靶細胞之對照樣本用於設定FACS門控。靶細胞及非靶細胞之數目經量化。將存活之靶細胞 (GFP+) 與非靶向對照細胞 (CT-Violet) 之比率進行計算且標準化為不具有Ab之樣本。耗盡之百分比經計算如下： $1 - ((\text{靶向}/\text{非靶向}) / (\text{不具有Ab之靶向}/\text{不具有Ab之非靶向}))$ 。

效應細胞:靶細胞之比率對西妥昔單抗消除之影響

[0439]

如上文所描述執行該實驗，例外為，所使用之PBMC預先冷

凍，且靶細胞及非靶向對照細胞以 1:1 比率混合，且隨後在 1 $\mu\text{g/mL}$ 之西妥昔單抗或同種型對照之情況下，使用效應PBMC以 50:1、25:1、5:1 及 1:1 效應細胞:靶細胞比率於U形底 96 孔盤中共培養。

結果

[0440]

在外周血單核細胞（PBMC）中測試eTag作為消除域之表現的效應。PBMC經分離且使用包括可操作地連接至啟動子的eTag之慢病毒載體來轉導。對照細胞不經轉導。在 0 至 10 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度下使用西妥昔單抗來處理細胞，且在於所有經測試濃度下之西妥昔單抗投與之後 22 小時偵測細胞消耗（圖 7A）。使用 1 $\mu\text{g/mL}$ 之西妥昔單抗濃度，以經轉導之效應（E）細胞與對照（T）細胞之所有比率觀測消耗，其中消耗大致上隨經轉導之效應（E）細胞之比率增加而增加（圖 7B）。因此，表現eTag之T細胞可在PBMC之存在下藉由eTag之抗體而有效地消除。

值得注意，改進型實驗使用FLAG抗原決定位來執行，其中FLAG抗原決定位表現為定位於CD8 訊號肽與CAB-CAR F1-1-15及F1-2-15 之條件活性ASTR之間的CAB-CAR多肽之部分。儘管使用此等初始非優化構建體於一些情況下稍微減弱，然而此等CAB-CAR仍保持其殺死表現其同源抗原之靶細胞及誘發細胞介素反應之能力。因此，消除域可表現為不破壞其活性之CAB-CAR之部分。

實例 3.細胞介素之條件活性嵌合抗原受體誘導

[0441]

此實例顯現藉由靶向Ax1或Ror2 之條件活性嵌合抗原受體之pH依賴性細胞介素誘導。在對照CHO細胞或表現Ax1

(CHO-AXL) 之 CHO 細胞或 Ror2 細胞 (CHO-ROR2) 分別與表現具有抗 Ax1 ASTR (F1-2-15) 之 CAB-CAR 或表現具有抗 Ror2 ASTR (F1-1-15) 之 CAB-CAR 之 T 細胞的 pH 6.7 或 pH 7.4 共培養之後，量測 IL-2 及 IFN- γ 於培養基中之細胞介素含量。將來自此等共培養之細胞介素含量與陰性對照及陽性對照中之細胞介素含量進行比較。

[0442]

藉由使用編碼 CAB-CAR F1-1-15 (Ror2)、F1-2-15 (Ax1) 或僅 eTag (F1-0-01) 之慢病毒顆粒轉導 Pan T 細胞 (AllCell) 來預先產生經低溫保藏之效應細胞，且如實例 1 中所描述擴增。在第 1 天，效應細胞經解凍且允許由培養液於 37°C 及 5% CO₂ 下於由 X-VIVO15 (Lonza #04-418Q)、5% 人類 AB 血清 (Valley Biomedical Inc., #HP1022)、10 mM N-乙醯基 L 半胱氨酸 (Sigma-Aldrich #A9165) 組成且補充有 100 IU/ml IL2 之人類 T 細胞培養基中自冷凍保藏再生 2 天。在第 2 天，將 3.010⁴ CHO、CHO-Ror2 或 CHO-Ax1 接種於含有 40mM HEPES/PIPES 之 100 μ l 人類 T 細胞培養基中之 96 孔平面底組織培養盤之孔中，且調節至 pH 6.7 或 pH 7.4 並在 37°C 及 5% CO₂ 下培養整夜。在第 3 天，在適當 pH 下，在 140 μ l 之人類 T 細胞培養基中以 3:1 之效應細胞/靶細胞比率將經靜置之效應細胞添加至實驗孔。在 37°C 及 5% CO₂ 下，將效應細胞及靶細胞共培養整夜，且於次日收集上清液並藉由 ELISA 測試細胞介素含量。每一實驗條件進行三次。

結果

[0443]

如圖 8A 至圖 8D 中所顯示，使用含有編碼抗 Ax1 CAB-CAR F-2-15 或抗 Ror2 CAB-CAR F-1-15 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 T

細胞經活化以分別以pH依賴性方式回應於識別表現Ax1或Ror2之CHO細胞而分泌細胞介素。如圖 8A中所顯示，當在pH為 6.7 而非pH為 7.4 下，且僅在表現Ax1之CHO之存在下培養時，使用含有編碼抗Ax1 CAB-CAR F1-2-15 之核酸的慢病毒顆粒轉導之T細胞分泌IL-2。類似地，如圖 8B中所顯示，當在pH為 6.7 而非pH為 7.4 下培養，僅在表現Ax1之CHO細胞之存在下時，使用含有編碼抗Ax1 CAB-CAR F1-2-15 之核酸的慢病毒顆粒轉導之T細胞分泌IFN- γ 。如圖 8C中所顯示，相比於pH 7.4，表現抗Ror2 CAB-CAR F-1-15 之T細胞在培養於pH 6.7 下時分泌大約 2.5 倍IL-2，且在表現Ror2 之CHO細胞之存在下僅分泌可估計數量之IL-2。類似地，如圖 8D中所顯示，相比於pH 7.4，且在表現Ror2之CHO細胞之存在下，表現抗Ror2 CAB-CAR F-1-15 之T細胞在培養於pH 6.7 下時分泌大約 2 倍IFN- γ 。包括表現對照EGFR多肽而非抗Ax1或抗Ror2 CAB-CAR之效應T細胞之樣本並未回應於在任何pH下與CHO細胞中之任一者共培養而增加IL2 或IFN- γ 之分泌。因此，當在體外於T細胞上表現時，本文中所鑒定之針對Ax1及Ror2 之例示性條件活性CAR在暴露於CAR同源抗原時自此等T細胞誘發條件性細胞介素分泌。此外，此等實驗提供用於活化表現本文中所提供之CAB-CAR之T細胞之非限制性例示性體外方法。

實例 4.表現條件活性生物CAR之T細胞之細胞毒性活性可藉由改變pH來控制。

[0444]

以下實例說明，表現CAB-CAR之經轉導之T細胞（亦稱為效應細胞）之細胞毒性活性可如何藉由改變微環境之pH來調節。在此實例中，編碼能夠結合同源抗原Ax1(抗Ax1)之CAB-CAR

之核酸是用於產生不可複製型重組慢病毒顆粒。使用慢病毒顆粒轉導Pan T細胞，且在改變培養基之pH之前及之後使用即時細胞分析（RTCA）來比較效應細胞之細胞毒性活性。

CAB-CAR效應T細胞之產生

[0445]

如實例 1 中所描述來產生編碼針對Ax1（F1-2-15）及含有eTag（SEQ ID NO:78）但缺失CAR（F1-0-01）之陰性對照（C1）之CAB-CAR之慢病毒顆粒。此等慢病毒顆粒用於轉導Pan T細胞（AllCell），且經轉導之T細胞如實例 1 中所描述經允許擴增 10 至 12 天。此等經轉導之T細胞經低溫保藏以用於作為效應細胞之後續使用。

pH變化細胞毒性分析

[0446]

在藉由添加NaHCO₃或NaOH改變pH之前及之後的經轉導之T細胞之細胞毒性活性是使用xCELLigence系統來量測。簡言之，在實驗前一天，使用含有 40 mM HEPES及 40 mM PIPES（pH 6.7）之X-VIVO 15 培養基將靶細胞（用在細胞表面上表現Ax1之構建體穩定地轉染之CHO細胞（CHO-Ax1 細胞））以 10,000 個細胞/孔接種至 96 孔E-盤（ACEA；San Diego，CA）中。解凍先前使用含有編碼如上文所論述而產生之F1-2-15 或C1（分別為F1-2-15-VP及C1VP）之核酸之慢病毒顆粒轉導的經冷凍保存之效應細胞，且在含有 100 IU/mL之IL-2（R&D Systems，Minneapolis，MN）之X-VIVO 15 培養基中培養兩天。在實驗當天，洗滌使用F1-2-15-VP或C1VP轉導之細胞且將其再懸浮於含有 40 mM HEPES及 40 mM PIPES（pH 6.7）之X-VIVO 15 培養基中，且接著以 1:1 之效應細胞/靶細胞比率（E/T）添加至實驗

孔中。

[0447]

每 5 分鐘獲取在 xCELLigence 系統 (ACEA) 上量測之阻抗讀數且報告為細胞指數 (CI) 以定量細胞匯合度作為細胞增殖/細胞裂解之量測。在添加效應細胞後大約 3 小時, 將 8 μ l 之 7.5% NaHCO₃ 或 14 μ l 之 0.5 M NaOH 添加至具有含有 40 mM HEPES 及 40 mM PIPES (pH 6.7) 的 X-VIVO 15 培養基之孔中以將 pH 自 6.7 升高至 7.4。在添加效應細胞之後繼續阻抗讀數大約 20 小時。如下計算特異性細胞溶解之百分比: $((CI_{\text{靶向物+經C1VP轉導之效應T細胞}} - (CI_{\text{靶向物+經F1-2-15-VP轉導之效應T細胞}})) / (CI_{\text{靶向物+經C1VP轉導之效應T細胞}}) \times 100$ 。

對 RTCA 殺傷分析之 HCl 切換

[0448]

藉由添加 HCl 改變 pH 之前及之後的經轉導之 T 細胞之細胞毒性活性是使用 xCELLigence 系統來量測。簡言之, 在實驗前一天, 使用含有 40 mM HEPES 及 40 mM PIPES (pH 7.4) 之 X-VIVO 15 培養基將 CHO-Ax1 細胞以 10,000 個細胞/孔接種至 96 孔 E-盤中。解凍使用 C1VP 或 F1-2-15-VP 轉導之經冷凍保藏之效應細胞, 且在含有 100 IU/mL 之 IL-2 之 X-VIVO 15 培養基中培養兩天。在實驗當天, 洗滌使用 F1-2-15-VP 或 C1VP 轉導之細胞且將其再懸浮於含有 40 mM HEPES 及 40 mM PIPES (pH 7.4) 之 X-VIVO 15 培養基中, 且接著以 1:1 之效應細胞/靶細胞比率 (E/T) 添加至實驗孔中。

[0449]

每 5 分鐘獲取阻抗讀數且報告為細胞指數 (CI)。效應細胞添加後大約 3 小時, 將 8 μ l 之 1 M HCl 添加至具有含有 40 mM

HEPES 及 40 mM PIPES (pH 7.4) 之 X-VIVO 15 培養基之孔中以將 pH 自 7.4 切換至 6.7。在添加效應細胞之後繼續阻抗讀數大約 20 小時。如下計算特異性細胞溶解之百分比：
$$\left((CI \text{ 靶向物} + \text{經 C1VP 轉導之效應 T 細胞}) - (CI \text{ 靶向物} + \text{經 F1-2-15-VP 轉導之效應 T 細胞}) \right) / (CI \text{ 靶向 C1VP}) \times 100。$$

結果

[0450]

在 pH 6.7 及 pH 7.4 下比較能夠在降低的 pH 下結合具有增加的活性之同源抗原 Ax1 之 CAB-CAR 之細胞毒性活性。使用含有編碼 F1-2-15、抗 Ax1 CAB-CAR 之核酸之慢病毒顆粒轉導之 T 細胞是用於殺死表現 Ax1 之 CHO 細胞，且隨後升高 pH 以測定細胞毒性活性是否可藉由 pH 變化抑制。如圖 9A 及圖 9B 中所顯示，添加 NaHCO₃ 或 NaOH 至活性 CAR-T 細胞之微環境以升高抑制表現 CAB-CAR 之 T 細胞之細胞毒性活性的媒質之 pH。此等結果顯示，表現活性 CAB-CAR 之 T 細胞可殺死表現靶向物之細胞，且隨後此殺死活性可藉由增加微環境之 pH 來抑制。

[0451]

亦測定待藉由 pH 變化來活化之表現 CAB-CAR 之 T 細胞之細胞毒性活性的能力。如圖 9C 中所顯示，表現抗 Ax1 CAB-CAR 之 T 細胞對 CHO-Ax1 細胞之細胞毒性活性在 pH 為 7.4 下較低且該活性是藉由添加 HCl 以降低微環境之 pH 來增加。

[0452]

類似結果在使用 F1-2-22 (針對 Ax1 之 CAB-CAR) 及 F1-1-15 (針對 Ror2 之 CAB-CAR) 來重複此等實驗時獲得。此外，此等結果顯示，表現 CAB-CAR 之 T 細胞之細胞毒性活性可藉由微環境內之 pH 之變化 (藉由在升高 pH 之後降低細胞毒性活性及在降

低pH之後增加細胞毒性活性兩者)來調節。在此非限制實例中，pH自pH 6.7 升高且自pH 7.4 降低。

實例 5.碳酸氫鹽投與可升高小鼠中之腫瘤微環境之pH。

[0453]

以下實例顯示，活體內腫瘤微環境之pH可藉由投與藥用試劑來調節。在此實例中，藥用試劑為碳酸氫鈉，且腫瘤微環境為小鼠中之CHO異種移植腫瘤。該實例包括量測活體內及活體外兩者之腫瘤微環境之pH的兩種方法。

[0454]

大多數固體腫瘤之胞外微環境為酸性的，通常具有在 6.5 與 6.9 之間的pH。相反，正常組織pH為鹼性的，典型地具有在 7.2 與 7.5 之間的pH。然而，直接地量測腫瘤微環境之活體內pH可能為困難的。幸運的是，組織蛋白酶之相關蛋白酶活性在較低pH下較高且在較高pH下較低。因此，腫瘤內組織蛋白酶活性之量測可充當腫瘤微環境之pH之替代量測。為量測組織蛋白酶B、L、S、K、V及D之活體內活性，使用近紅外ProSense 750 FAST探針（PerkinElmer）。為進一步確認藉由碳酸氫鈉之投與的腫瘤微環境中之pH之調節，使用酚紅處理所切除腫瘤並注意顏色。酚紅為經歷pH依賴性顏色轉換之pH指示劑。酚紅之鈉鹽廣泛用於細胞培養培養基中以鑒定pH值。酚紅之溶液在 6.4 或更低之pH下呈黃色，或在約pH 7.0 下呈橙色，在約pH 7.4 下呈紅色且在高於pH 7.8 下紫色。

[0455]

根據研究所動物看護與使用委員會（Institutional Animal Care and Use Committee）批准之方案來治療小鼠。皮下（sc）中國倉鼠卵巢（CHO）腫瘤異種移植是建立於 12 至 14 周齡雌

性NOD-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}/Bcgen(B-NSG)小鼠(Beijing Biocytogen Co. Ltd.) 之後腿中。簡言之，在DPBS (ThermoFisher) 中洗滌經培養之CHO細胞 (ATCC , Manassas , VA) ，經計數，並再懸浮於冷DPBS中且在冰上以 1.5×10^6 個細胞/200 微升之濃度與合適體積之Matrigel ECM (Corning ; 最終濃度 5 mg/mL) 混合。

[0456]

動物用於在注射之前移除毛髮 (Nair) 之情況下使用標準經批准之麻醉之注射。將含 200 μ l之細胞懸浮液之ECM皮下注射至小鼠之後腿中。一旦腫瘤可觸，則使用側徑計 2 次/周量測腫瘤。腫瘤體積使用以下公式來計算：(最長直徑*最短直徑²) /2。當平均腫瘤體積達至 200 mm³ 時，將小鼠隨機地分配至各別治療組。

[0457]

在投與碳酸氫鹽兩天前，將B-NSG小鼠之飲用水自酸性改變為常規pH之經高壓滅菌之純化水。在隨後一天，經由 100 μ l 尾部靜脈注射 (4 nmol ProSense 750 FAST探針/100 μ l PBS) 將 750 ProSense FAST探針投與至 6 個攜帶有CHO-異種移植腫瘤之小鼠。單獨一組之攜帶有CHO-異種移植腫瘤之小鼠不經處理。在隨後一天，投與碳酸氫鈉且使用Caliper IVIS Lumina XR對使用ProSense 750 FAST探針處理之小鼠執行成像。簡言之，使用含 3% O₂ 2 L/min異氟烷之O₂ 載氣以 2 L/min麻醉小鼠，且隨後置放向成像期間經麻醉小鼠供應 1.5%異氟烷之鼻錐。影像採集由 5 秒之近紅外探針 (745/810 nm激勵/發射波長) 之暴露組成。將螢光影像覆蓋於小鼠之正常光影像上。在投與PBS (對照) 或碳酸氫鈉之前獲取時間 0 (處理前) 影像。隨後經由腹膜內注射 (ip) 向小鼠投與 1 毫升/小鼠PBS (對照 , ThermoFisher) 或 1

毫升/小鼠 1 M碳酸氫鈉（Shanghai Experiment Reagent Co., LTD）。隨後在投與PBS或碳酸氫鹽後 30 min對小鼠進行成像。調整所收集螢光影像以具有相同之最小值、最大值及臨限值。在此研究中將光子計數定義為相對螢光單位（RFU）。藉由將各小鼠中之來自 30 min時間點之光子計數正規化為處理前時間點（時間 0；100%）來計算RFU。由於時間 0 處理前值處之各小鼠中之螢光值之間的可變性，不同時間點處之所觀測螢光強度值僅針對個別小鼠正規化而不針對平均處理前值。

[0458]

在實驗之單獨臂中，未接收NIR組織蛋白酶探針之 6 隻小鼠在腹膜內投與PBS或碳酸氫鈉後 1.5 小時利用頸椎脫位來安樂死。自各小鼠切除CHO異種移植腫瘤。使用解剖刀將異種移植腫瘤分成兩半且置放於皮式培養皿（petri dish）上。隨後使用解剖刀重複地切割/分割腫瘤組織半部。將水或 0.05%酚紅溶液（50 mg酚紅/100 ml水）分別逐滴添加至各腫瘤半部。注意顏色，且一旦移除腫瘤異種移植樣本，即獲取經處理腫瘤異種移植及留在皮式培養皿上之酚紅溶液之影像。

結果

[0459]

圖 10 顯示來自在投與PBS（對照；n=3）或碳酸氫鹽（n=3）之前及之後攜帶CHO-異種移植腫瘤之小鼠中之成像腫瘤內組織蛋白酶活性的RFU結果（具有SEM之平均值）。此等結果表明，碳酸氫鈉投與可升高活體內腫瘤微環境之pH，如由在腹膜內碳酸氫鈉投與後觀測到之降低的組織蛋白酶活性所證明。

[0460]

使用自相對於經PBS處理之小鼠（n=3）的經碳酸氫鈉處理

之小鼠（ $n=3$ ）切除之腫瘤組織觀測到酚紅指示劑自黃色/橙色變為紅色的顏色改變。此等結果表明，在腹膜內投與後，碳酸氫鈉投與升高活體內腫瘤微環境之pH，如由酚紅指示劑自黃色/橙色變為紅色的顏色改變所證明。

實例 6.藉由針對ROR2 及AXL的CAB-CAR之活體內腫瘤之靶向依賴性殺死。

[0461]

執行顯現出具有針對於體外分析中表現Axl或Ror2 細胞的條件性細胞毒性活性具有針對於活體中表現Axl或Ror2 的腫瘤細胞之細胞毒性活性之實驗。選擇使用NSG異種移植模型或NOD Scid Gamma小鼠，其不作為用以探測CAB-CAR之特異性及功效之機制與抗人類scFv靶向物反應。NSG為缺失成熟T細胞、NK細胞及B細胞之小鼠之品系且在最具免疫缺陷之現有描述之中。有必要去除此等細胞組分以使得衍生自單核細胞之人類外周血能夠移入而無天然免疫。由於鼠胞外公共 γ 鏈缺失（其使得過繼轉移之人類細胞接收此類細胞介素），一般在放療或淋巴細胞清除化療之後僅存在於人類中之體內平衡細胞介素之濃度經達成。同時，此等動物亦可經利用以將腫瘤異種移植靶向物移入至檢驗CAR殺死靶向物表現腫瘤之功效。儘管效應細胞產物中之異種移植T細胞受體抗原之存在將最終導致移植物抗宿主疾病，然而此等模型使得動物藥理學及急性耐受性之短期評估能夠進行。

[0462]

經穩定轉染以表現人類ROR2（CHO-ROR2）或人類Axl（CHO-Axl）之親代中國地鼠卵巢（CHO）細胞及轉基因CHO細胞經利用以產生相同靶向腫瘤，從而測定CAB-CAR效應細胞

殺死表現同源抗原之腫瘤之特異性及功效。因為全部 3 個細胞系均具有相同異種移植人類白細胞抗原（HLA）及其他非特異性抗原，所以CAB-CAR細胞於腫瘤微環境中對腫瘤靶向物之特異性可經測試而不考慮供體淋巴細胞及靶向腫瘤細胞之HLA活性之變化。在與Matrigel人造底膜相組合皮下投與至NSG小鼠中之後，親代及轉基因CHO變體與彌漫性惡性腫瘤一起迅速生長。

[0463]

根據製造商之指示，藉由使用Ficoll-Paque™（General Electric）之密度梯度離心、使用Sepax 2 S-100 器件（Biosafe；14000）上之CS-900.2 套組（BioSafe；1008）自來自經知情同意之健康志願者之ACD外周血分離PBMC。將 5.0×10^7 個存活之PBMC接種於 1 L G-Rex（Wilson-Wolf）中，且使用補充有 100 IU/ml（IL-2）（Novoprotein）、10 ng/ml（IL-7）（Novoprotein）及 50 ng/ml抗CD3 抗體（OKT3，Novoprotein）之完全OpTmizer™ CTS™ T細胞擴增SFM將體積調至 100 ml，從而活化PBMC以用於病毒轉導。在 37°C 及 5% CO₂ 下培育整夜之後，將如實例 1 中所描述而製造之編碼CAR構建體之慢病毒顆粒直接添加至經活化之PBMC且在 37°C 及 5% CO₂ 下培育整夜。在隨後一天，使用補充有 10 mM NAC之完全OpTmizer™ CTS™ T細胞擴增SFM將各G-Rex之培養基體積調至 1 L。另外，在第 2 天且其後每 48 小時，將 100 IU/ml IL-2（Novoprotein）及 10 ng/ml IL-7（Novoprotein）添加至各孔。在收集之前，允許該等細胞自原血採集（第 0 天）擴增達至第 12 天。

[0464]

為測試針對ROR2 之CAB-CAR，如實例 5 中所描述，在冰上以 1.5×10^6 個細胞 /200 μl 使 12 至 14 周齡之雌性

NOD-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}/Begen (B-NSG) 小鼠 (Beijing Biocytogen Co. Ltd.) 於 Matrigel ECM 中皮下接種親代 CHO 細胞或 CHO-ROR2 細胞。當腫瘤已達 $>200\text{mm}^3$ 於模型重腫瘤負荷治療時，藉由使用 4×10^6 使用含有編碼使用上文段落中所提供之細胞處理方案所製備的 F1-1-15 (n=6) 或 F1-0-01 (n=6) (見構建體細節之實例 1 及 3) 之核酸的慢病毒顆粒轉導的 T 細胞或使用 PBS (n=6) 之尾部靜脈注射為小鼠靜脈 (IV) 投藥。使用測徑器以每週 3 次量測腫瘤，且使用以下公式計算腫瘤體積：(最長直徑 * 最短直徑²) / 2。至第 13 天，所有動物達至來自腫瘤負荷之屍體解剖準則。

[0465]

為測試針對 AXL 之 CAB-CAR，如實例 5 中所描述，在冰上以 1.5×10^6 個細胞 / 200 μl 使 7 至 9 周齡之雌性 B-NSG 小鼠於 Matrigel ECM (最終濃度 5mg/ml) 中皮下接種親代 CHO 細胞或 CHO-AXL 細胞。當腫瘤達至 $>100\text{mm}^3$ 於模型重腫瘤負荷治療時，開始效應細胞的 IV 或腫瘤內 (IT) 投藥。第一組小鼠藉由使用 8×10^6 之使用含有編碼使用上文段落中所提供的細胞處理方案所製備之 F1-2-15 (n=6)、F1-2-22 (n=6) 或 F1-0-01 (n=6) (見構建體細節之實例 1 及 3) 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 T 細胞尾部靜脈注射，或使用 PBS (n=6) IV 投藥。第二組小鼠使用 8×10^6 之使用含有編碼 F1-2-15 (n=6)、F1-2-22 (n=6) 或 F1-0-01 (n=6) 之核酸之慢病毒顆粒轉導之 T 細胞，或使用 PBS (n=6) IT 投藥。第三組小鼠藉由使用 8×10^6 之使用含有編碼 F1-2-15 (n=6)、F1-2-22 (n=6) 或 F1-0-01 (n=6) 之核酸之慢病毒顆粒的 T 細胞尾部靜脈注射，或使用 PBS (n=6) IV 投藥，且小鼠在前 3 天每天於遠離腫瘤之對側皮下側接受 IL-2 (50KIU) 之皮

下注射。使用測徑器以每週 3 次量測腫瘤，且使用以下公式計算腫瘤體積： $(\text{最長直徑} \times \text{最短直徑}^2) / 2$ 。與來自腫瘤負荷之屍體解剖準則一致，所有動物經安樂死。

結果

[0466]

實例 1 中所揭示之一些代表性 CAB-CAR 之活體內腫瘤細胞殺死活性使用經移入之表現 Ror2、Ax1 或兩者均不表現之腫瘤細胞於鼠模型中測試。相對於抗 Ror2 CAB-CAR，如圖 11A 中所顯示，與 PBS 對照或僅經 E-Tag 慢病毒轉染之 T 細胞（F1-0-01）相比，使用 4×10^6 之使用含有編碼 F1-1-15 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 T 細胞 IV 施藥之小鼠對 ROR2 陰性腫瘤生長不具有影響。相反，如圖 11B 中所顯示，將相同細胞製劑 IV 投與至人類表現 Ror2 之腫瘤中僅藉由 F1-1-15 顯現 Ror2 陽性腫瘤之顯著腫瘤抑制。此等資料顯現腫瘤微環境於此經移入之腫瘤鼠模型中於活體內再產生，且本文中所提供的經基因修飾之表現例示性抗 Ror2 CAB-CAR 之 T 細胞能夠接近固體腫瘤且驅使活體內靶細胞殺死而不管移入有靶向物之腫瘤細胞之迅速倍增時間。

[0467]

相對於抗 Ax1 CAB-CAR，如圖 12A 中所顯示，與 PBS 對照或僅經 E-Tag 慢病毒轉染之 T 細胞（F1-0-01）相比，使用 8×10^6 之使用含有編碼 F1-2-15 或 F1-2-22 之核酸的慢病毒顆粒轉導之 T 細胞腫瘤內（IT）投藥之小鼠對 Ax1 陰性腫瘤生長不具有影響。相反，如圖 12B 中所顯示，將相同細胞製劑 IT 投藥至人類表現 Ax1 之腫瘤中藉由 F1-2-15 及 F1-2-22 顯現 Ax1 陽性腫瘤之顯著腫瘤抑制。儘管與表現 F1-1-15 之細胞殺死表現 Ror2 之腫瘤之能力相比，表現 F1-2-15 或 F1-2-22 之細胞於針對表現 Ax1 的腫瘤之活

體內殺死測試中為等勢的，然而相比於局部注射（圖 13A對照與圖 13B），活體內腫瘤生長抑制在IV投藥之後仍不隨時間持續。與不具有IL-2 之IV投藥相比，將全身IL-2 投與至動物中 3 天（圖 14A對照與圖 14B）導致改良之抗腫瘤活性。此等資料顯現腫瘤微環境再次於此經移入之腫瘤鼠模型中活體內再產生且經基因修飾之表現例示性抗 Ror2 CAB-CAR F1-2-15 及 F1-2-22 之T細胞能夠接近固體腫瘤且活體內細胞殺死，而不管靶向經移入之腫瘤細胞之迅速倍增時間。此外，使用本文中所提供之例示性抗 Ror2 及抗 Axl CAB-CAR之此等實驗顯現此類 CAB-CAR對用於活化表現此等CAB-CAR之T細胞之活體內方法有效。

[0468]

熟習此項技術者可在本揭示之範疇及精神下設計許多修改及其他實施例。實際上，可在不改變本揭示之基本態樣之情況下由熟習之技術者對所描述之材料、方法、圖式、實驗、實例及實施例進行變化。所揭示實施例中之任一者可結合其他所揭示之實施例來使用。

[0469]

在一些情形中，一些概念已參考特定實施例進行描述。然而，一般熟習此項技術者中之一者應理解，可在不脫離如以下申請專利範圍中所闡述之本發明之範疇的情況下作出各種修改及變化。相應地，說明書及圖式將視為說明性而非限制性的，且所有此類修改意欲包括於本發明之範疇內。

表 3.SEQ ID NO之序列

SEQ ID NO:	名稱	序列
------------	----	----

1	CD137 共刺激域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
2	CD28 共刺激域	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
3	ICΔ共刺激域	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAYAAARDFAAYRS
4	ICOS共刺激域	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL
5	OX40 共刺激域	RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
6	CD27 共刺激域	HQRRKYRSNKGESVPEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPE PACSP
7	BLTA共刺激域	CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRQNSQ VLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASL NHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS
8	CD30 共刺激域	RRACRK RIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGA SVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGP SSPRDLPEPRVSTEHTNKNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGR GLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEE EGKEDPLPTAASGK
9	GITR共刺激域	HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPPEEERGERSA EEKGRLGDLWV
10	HVEM共刺激域	CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVT TVAVEETIPSFTGRSPNH
11	CD3Z同功異型物 1 活化域	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGV ILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
12	CD3Z同功異型物 2 活化域	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGV ILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
13	CD3Z 3 活化域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
14	CD3Z 4 活化域	NQLYNELNLGRREEYDVLDKR
15	CD3Z 5 活化域	EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
16	CD3Z 6 活化域	DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
17	CD3D 1 活化域	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELED RVFVNCNTSITWVE GTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQV

		HYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGR LSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
18	CD3D 2 活化域	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVE GTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQV HYRTADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
19	CD3D 3 活化域	DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN
20	CD3E 1 活化域	MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSIS GTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSL KEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD MSVATIVIVDICITGGLLLLIVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGG RQRGQNKERPPPVPNPDIPIRKGQRDLYSGLNQRI
21	CD3E 2 活化域	NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQ
22	CD3G 1 活化域	MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVL LTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGM YQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFV LAVGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQ YSHLQGNQLRRN
23	CD3G 2 活化域	DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN
24	CD79A 1 活化域	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASL MVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGP GEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLVR QPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQ NEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTQD VGSLNIGDVQLEKP
25	CD79A 2 活化域	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASL MVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGP GEDPNEPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFR KRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQ GTQDVGSLNIGDVQLEKP
26	CD79A 3 活化域	ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG
27	DAP12 1 活化域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAAQSDCSCSTVSPGVL AGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITE TESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK
28	DAP12 2 活化域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAAQSDCSCSTVSPGVL AGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITET ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ
29	DAP12 3 活化域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVL AGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITET ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK

30	DAP12 4 活化域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLT VLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQR SDVYSDLNTQRPYYK
31	DAP12 5 活化域	ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ
32	FCER1G 1 活化域	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCR LKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ
33	FCER1G 2 活化域	DGVYTGLSTRNQETYETLKHE
34	DAP10 活化域	RPRRSPAQDGKVYINMPGRG
35	CD28 活化域	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
36	ZAP70 活化域	MPDPAAHLPPFFYGSISRAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSL GGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAGGKAHCGPAELCEF YSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVR QTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTRE EAERKLYSGAQTDGKFLLRPRKEQGTYSLSLIYGKTVYHYLIS QDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKLKADGLIYCLKEACPN SSASNASGAAAPTLPAPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITS PDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLFLKRDNLLIADIEL GCGNFGSVRQGVYRMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMR EAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLV GKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLL VNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWYAPECI NFRKFSSRSDVWSYGVTMWEALSYGQKPYKKMKGPVMAFI EQGKRMECPPECPELYALMSDCWIYKWEDRPDFLTVEQRM RACYYSLASKVEGPPGSTQKAEACA
37	HA抗原決定位	YPYDVPDYA
38	FLAG抗原決定位	DYKDDDDK
39	c-myc抗原決定位	EQKLISEEDL
40	His5 親和體	HHHHH
41	HisX6 親和體	HHHHHH
42	Strep Tag親和體	WSHPQFEK
43	RYIRS親和體	RYIRS
44	FHHT親和	FHHT

	體	
45	親和體	WEAAAREACCRECCARA
46	CD8 α跨膜域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
47	CD8 β跨膜域	LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC
48	CD4 跨膜域	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC
49	CD3 ζ跨膜域	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV
50	CD28 跨膜域	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV
51	OX40 跨膜域	VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL
52	CD7 跨膜域	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA
53	連接子 1	GGGGSGGGSGGGGS
54	連接子 2	GGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
55	連接子 3	GGGGSGGGSGGGGS
56	連接子 4	GGSG
57	連接子 5	GGSGG
58	連接子 6	GSGSG
59	連接子 7	GSGGG
60	連接子 8	GGGSG
61	連接子 9	GSSSG
62	鉸鏈 1	CPPC
63	鉸鏈 2	DKTHT
64	鉸鏈 3	CPEPKSCDTPPPCPR
65	鉸鏈 4	ELKTPLGDTTHT
66	鉸鏈 5	KSCDKTHTCP
67	鉸鏈 6	KCCVDCP
68	鉸鏈 7	KYGPPCP
69	鉸鏈 8	EPKSCDKTHTCPPCP
70	鉸鏈 9	ERKCCVECPCP
71	鉸鏈 10	ELKTPLGDTTHTCPRCP
72	鉸鏈 11	SPNMVPHAHHAQ
73	鉸鏈 12	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
74	CD8 訊號肽	MALPVTALLLPLALLLHAARP
75	CD8 柄-TM	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
76	CD28 柄	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLV

	-TM	VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
77	2A-1 裂解 訊號	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
78	eTAG消除 域	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIK HFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEIT GFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNIT SLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKI ISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRG PDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHV CHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLV VALGIGLFM
79	條件活性 scFv之Ax1 4007V VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIRQPPG KGLEWIGLIKPSNNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMY YCAHGHYESYEAMDYWGQGTLVTVSS
80	條件活性 scFv之Ax1 4007V VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQDVVSAVAWYQQKPGQ APRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQEHFSPPLTFGQGGTKVEIK
81	條件活性 scFv之Ror2 VL 4	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCSATSSVSYMHWYLQKPGQSPQ LLIYGTSNLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQRSSYPFTFGQGGTKVEIK
82	條件活性 scFv之Ror2 R98H VH	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGYSITTGY YWNWVRQAR GQRLEWIGYITYDGSKNYNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCSHFEGVWYGLDYWGQGTLVTVSS
83	條件活性 scFv之Ror2 Y33E VH	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGYSITTGEYWNWVRQAR GQRLEWIGYITYDGSKNYNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCSRFE G V W Y G L D Y W G Q G T L V T V S S
84	條件活性 scFv之Ror2 VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCRASESVDRYGNSFIHWYQQKP GKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQQTNE DPWTFGQGGTKVEIK
85	條件活性 scFv之Ror2 L3 4	QQX ₄₂ NX ₄₃ DPX ₄₄ TX ₄₅ （其中X ₄₂ 為T、I或P；X ₄₃ 為E或V；X ₄₄ 為 W或T；且X ₄₅ 為F或T）
86	條件活性 scFv之Ror2 VL 5	DIVLTQSPDSLAVSLGQRATISCRASESVDRYGNSFIHWYLQKP GQPPKLLIYRTYNLESGIPARFSGTGSRTDFTLTINPVEADDVAT YYCQQTNE DPWTFGQGGTKVEIK
87	條件活性 scFv之Ax1 H1 1	X ₁ GX ₂ TMN（其中X ₁ 為T或W；且X ₂ 為H或A）
88	條件活性 scFv之Ax1 H2 1	LIKPSNNGGTSYNQKFKG
89	條件活性	GX ₃ YX ₄ SYX ₅ AMDY（其中X ₃ 為H或D；X ₄ 為E或H；且X ₅ 為E或F）

	scFv之Axl H3 1	
90	條件活性 scFv之Axl L1 1	KASQDVX ₆ SAVA（其中X ₆ 為S或V）
91	條件活性 scFv之Axl L2 1	WX ₇ X ₈ TRX ₉ T（其中X ₇ 為A或Q；X ₈ 為S或D；且X ₉ 為H或D）
92	條件活性 scFv之Axl L3 1	QEHFSX ₁₀ PLX ₁₁ （其中X ₁₀ 為T或P；且X ₁₁ 為T或R）
93	條件活性 scFv之Axl WT VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFTGHTMNVIRQPPG KGLEWIGLIKPSNNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYCYCAHGHYESYFAMDYWGQGTLVTVSS
94	條件活性 scFv之Axl WT VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQA PRLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC QEHFSTPLTFGQGTKVEIK
95	條件活性 scFv之Ror2 H1 1	GYTX ₁ TEX ₂ TX ₃ H（其中X ₁ 為F或E；X ₂ 為Y或D；且X ₃ 為M或D）
96	條件活性 scFv之Ror2 H1 2	X ₄ GYSITGYYWN（其中X ₄ 為T或S）
97	條件活性 scFv之Ror2 H2 1	GX ₅ NX ₆ NNGGTGYNQKFKG（其中X ₅ 為E或I；且X ₆ 為T或D）
98	條件活性 scFv之Ror2 H2 2	YITYDGSKNYPNPSLKN
99	條件活性 scFv之Ror2 H3 1	GSLYSYGNSYFDY
100	條件活性 scFv之Ror2 H3 2	FEGVWX ₇ GLDY（其中X ₇ 為Y或G）
101	條件活性 scFv之Ror2 L1 1	SATSSX ₈ SYMH（其中X ₈ 為E或V）
102	條件活性 scFv之Ror2 L1 2	RASESVDRYGNSFIH
103	條件活性 scFv之Ror2	X ₉ TSNLAS（其中X ₉ 為G或H）

	L2 1	
104	條件活性 scFv之Ror2 L2 2	RTYNLES
105	條件活性 scFv之Ror2 L3 1	QQRSSYPFT
106	條件活性 scFv之Ror2 L3 2	QQTNEDPWT
107	條件活性 scFv之Ror2 WT VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGYWVWRQAR GQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCSRFEGLDYWGQGTLVTVSS
108	條件活性 scFv之Axl VL 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAAVWYQKPGQ APRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCEHFSPTLTFGQGTKVEIK
109	條件活性 scFv之Axl VL 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAAVWYQKPGQA PRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYY CCEHFSPTLTFGQGTKVEIK
110	條件活性 scFv之Axl VL 3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAAVWYQKPGQ APRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCEHFSPTLTFGQGTKVEIK
111	條件活性 scFv之Axl VL 4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAAVWYQKPGQ APRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCEHFSPTLRFQGTKVEIK
112	條件活性 scFv之Axl VH 1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFTGATMNWIRQPPG KGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCAHGHSYSEAMDYWGQGTLVTVSS
113	條件活性 scFv之Axl VH 2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIRQPPG KGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCAHGHSYSEAMDYWGQGTLVTVSS
114	條件活性 scFv之Axl VH 3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFTGHTMNWIRQPPG KGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCAHGHSYSEAMDYWGQGTLVTVSS
115	條件活性 scFv之Ror2 VH 1	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWMKQSHR KSLEWIGGINNNGGTGYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRS LTSEDSAVYFCARGSLYSYGNISYFDYWGQGTLVTVSS
116	條件活性 scFv之Ror2 VH 2	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTETEDTHWMKQSHR KSLEWIGGINNNGGTGYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELR SLTSEDSAVYFCAHGSLYSYGNISYFDYWGQGTLVTVSS
117	條件活性 scFv之Ror2 VH 3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEYTMHWVRQAR GQRLEWIGGINNNGGTGYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCAHGSLYSYGNISYFDYWGQGTLVTVSS

118	條件活性 scFv之Ror2 VH 4	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTEYTMHWVRQAPG QGLEWMGGINTNNGGTGYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCAHGSLYSYGNSYFDYWGGQGLTVTVSS
119	條件活性 scFv之Ror2 VH 5	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTEYTMHWIRQSPSR GLEWLGGINTNNGGTGYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCAHGSLYSYGNSYFDYWGGQGLTVTVSS
120	條件活性 scFv之Ror2 VH 6	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTGYIWNWIRQFPG NKLEWMAYITYDGSKNYPNPSLKNRISITRDTSKNKFLLKLSV TSEDATYYCSRFEFVWYGLDYWGQGLTVTVSS
121	條件活性 scFv之Ror2 VH 7	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTGYIWNWIRQFPG NKLEWMAYITYDGSKNYPNPSLKNRISITRDTSKNKFLLKLSV TSEDATYYCSHFEGVWGGLDYWGQGLTVTVSS
122	條件活性 scFv之Ror2 VL 1	QIVLTQSPAISASPGKVTITCSATSSVSIMHWFQKPGTSPK LWIYGTSLNLSGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYC QQRSSYPFTFGQGTKVEIK
123	條件活性 scFv之Ror2 VL 2	QIVLTQSPAISASPGKVTITCSATSSVSIMHWFQKPGTSPK LWIYHTSLNLSGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYC QQRSSYPFTFGQGTKVEIK
124	條件活性 scFv之Ror2 VL 3	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSIMHWYQKPGQAP RLLIYGTSLNLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CQQRSSYPFTFGQGTKVEIK
125	野生型CD8 莖	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
126	野生型 CD28 柄	FCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP
127	CD3Z 7 活 化域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
128	來自 F1-2-15 之 scFv	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIRQPPG KGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAVAW YQQKPGQAPRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQEHFSPPLTFGQGTKVEIK
129	來自 F1-2-13 之 scFv	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIRQPPG KGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAVA WYQQKPGQAPRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS LQPDDFATYYCQEHFSPPLTFGQGTKVEIK
130	來自 F1-1-19 之 scFv	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGEYWNWVRQAR GQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCSRFEFVWYGLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGG

1113263429-0

	H1 3	
141	條件活性 scFv之Ror2 H1 4	GYSITTGX ₂₉ YWN（其中X ₂₉ 為Y、E、R或T）
142	條件活性 scFv之Ror2 H2 3	X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ NNGGTGYNQKFKG（其中X ₅ 為G或S；X ₆ 為I或E；X ₇ 為N、C、L或V；且X ₈ 為T、D或E）
143	條件活性 scFv之Ror2 H2 4	YITYDGSX ₃₀ NYNPSLKN（其中X ₃₀ 為K或N）
144	條件活性 scFv之Ror2 H3 3	X ₉ X ₁₀ X ₁₁ SX ₁₂ YX ₁₃ YX ₁₄ X ₁₅ SYFX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ （其中X ₉ 為A、M或T；X ₁₀ 為R或H；X ₁₁ 為G或E；X ₁₂ 為L或F；X ₁₃ 為S或G；X ₁₄ 為G或D；X ₁₅ 為N或E；X ₁₆ 為D或L；X ₁₇ 為Y、C或T；且X ₁₈ 為W或L）
145	條件活性 scFv之Ror2 H3 4	CSX ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ VX ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ LDX ₃₈ （其中X ₃₁ 為R、G、H、W或Y；X ₃₂ 為F、C、N或Q；X ₃₃ 為E或S；X ₃₄ 為G、E、F、H、M、Q或S；X ₃₅ 為W、A、I、P、Q、T或V；X ₃₆ 為Y、G、N或Q；X ₃₇ 為G、S或T；且X ₃₈ 為Y或I）
146	條件活性 scFv之Ror2 L1 3	SATSSX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ MX ₂₂ （其中X ₁₉ 為V或E；X ₂₀ 為S或D；X ₂₁ 為Y、C或D；且X ₂₂ 為H、G或L）
147	條件活性 scFv之Ror2 L1 4	RASESVDRYGNSX ₃₉ IH（其中X ₃₉ 為F、S或T）
148	條件活性 scFv之Ror2 L2 3	X ₂₃ TSNLAS（其中X ₂₃ 為G、C、H或P）
149	條件活性 scFv之Ror2 L2 4	X ₄₀ TYX ₄₁ LES（其中X ₄₀ 為R、C、D、E或W；且X ₄₁ 為N或D）
150	條件活性 scFv之Ror2 L3 3	QX ₂₄ X ₂₅ SX ₂₆ YPFX ₂₇ X ₂₈ （其中X ₂₄ 為Q或E；X ₂₅ 為R或H；X ₂₆ 為S、D、G、I、Q或V；X ₂₇ 為T或D；且X ₂₈ 為F、D或E）
151	Ror2 CAB3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWIRQSPSRGLEWLGGINDNNGGTGYNQKFKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSLYSYGNSYFDYWGQGTLVTVSS
152	Ror2 CAB VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQRPGQSPRLIYHTSNLASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQRSSYPFTFGQGTKVEIK
153	來自 F1-1-11 之 scFv	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGYYWNWVRQARGQRLEWIGYITYDGSKNYNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCSHFEGVWYGLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCRASESVDRYGNSFIHWYQQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIP

		ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQTNEDPWTFGQGT KVEIK
154	來自 F1-1-17 之 scFv	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGEYWNWVRQAR GQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCSRFEQVWYGLDYWGQGTLVTVSSGGGGGSGG GGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDRYGNSF IHWYQQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEFTLTIS LQSEDAVYYCQQTNEDPWTFGQGT KVEIK
155	來自 F1-1-25 之 scFv	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQRPGQSPR RLIYHTSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQRSSYPFTFGQGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWIRQSPSRGLEWLG GINDNNGGTGYNQKFKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGSLYSYGN SYFDYWGQGTLVTVSS
156	來自 F1-1-26 之 scFv	LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWIRQSPSRGL EWLGGINDNNGGTGYNQKFKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGSLYSYGN SYFDYWGQGTLVTVSS
157	來自F1-1-9 之scFV	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGYWVWVRQAR GQRLEWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCSHFEGVWYGLDYWGQGTLVTVSSGGGGGSGG GGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDRYGNSF IHWYQQKPGKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEFTLTIS LQSEDAVYYCQQTNEDPWTFGQGT KVEIK
158	來自 F1-1-21 之 scFV	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDRYGNSFIHWYQQK PKAPKLLIYRTYNLESGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAV YYCQQTNEDPWTFGQGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQL QESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITTGEYWNWVRQARGQRL EWIGYITYDGSKNYPNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCSRFEQVWYGLDYWGQGTLVTVSS
159	來自F1-2-3 之scFV	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIRQPPG KGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCAHGHYESYEAMDYWGQGTLVTVSSGGGGGSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASQDVVSAAVAYQQKPGQAPRLLIYWQDTRHTGVPS RFSGSGSGTEFTLTISLQPD FAYYCQE HFSPLTFGQGT KVEIK
160	來自F1-2-8 之scFV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAAVAYQQKPGQ APRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD FAY YCQE HFSPLTFGQGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQ SGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGATMNWIRQPPGKLEWI GLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCAHGHYESYEAMDYWGQGTLVTVSS
161	來自	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVVSAAVAYQQKPGQ

	F1-2-10 之 scFV	APRLLIYWQDTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQEHFSPPLTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFWGAT MNWIRQPPGKGLEWIGLIKPSNGGTSYNQKFKGRVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYYCAHGHYESYEAMDYWGQGTLV TVSS
--	-------------------	---

【符號說明】

無。

【序列表】

- <110> 美商埃秀瑪生物技術公司
(EXUMA BIOTECH CORP.)
- <120> 用於結合 AXL 之嵌合抗原受體、經分離之重組 T 細胞、
載體及在體外活化 T 細胞的方法
- <130> 107P000122TW
- <140> 107101870
- <141> 2018-01-18
- <150> 62/447,898
- <151> 2017-01-18
- <150> 62/467,059
- <151> 2017-03-03
- <150> 62/530,193
- <151> 2017-07-08
- <160> 161
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 42
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的 CD137 共刺激域
- <400> 1

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> 2
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD28 共刺激域

<400> 2

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 3
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 IC-Δ 共刺激域

<400> 3

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala
20 25 30

Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 ICOS 共刺激域

<400> 4

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
1 5 10 15

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
20 25 30

Val Thr Leu
35

<210> 5
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 OX40 共刺激域

<400> 5

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
35

<210> 6
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD27 共刺激域

<400> 6

His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu
1 5 10 15

Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser

202530

Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser
354045

Pro

<210> 7
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 BLTA 共刺激域

<400> 7

Cys Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr
151015

Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln
202530

Thr Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr
354045

Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly
505560

Ser Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile

50 55 60

His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala
65 70 75 80

Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg
85 90 95

Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met
100 105 110

Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu
115 120 125

Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu
130 135 140

Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro
145 150 155 160

Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys
165 170 175

Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys
180 185

<210> 9
<211> 54
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 G1TR 共刺激域

<400> 9

His	Ile	Trp	Gln	Leu	Arg	Ser	Gln	Cys	Met	Trp	Pro	Arg	Glu	Thr	Gln
1				5					10					15	

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

Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Arg	Gly	Glu	Arg	Ser	Ala	Glu	Glu	Lys	Gly	Arg
			35				40						45		

Leu	Gly	Asp	Leu	Trp	Val
			50		

<210> 10

<211> 60

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 HVEM 共刺激域

<400> 10

Cys	Val	Lys	Arg	Arg	Lys	Pro	Arg	Gly	Asp	Val	Val	Lys	Val	Ile	Val
1				5					10					15	

Ser	Val	Gln	Arg	Lys	Arg	Gln	Glu	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala	Thr	Val	Ile
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

202530

Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu
354045

Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His
505560

<210> 11
<211> 163
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3Z 同工異型物 1 活化域

<400> 11

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
151015

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
202530

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
354045

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
505560

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

1113263429-0

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

Leu Pro Pro Arg

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3Z 3 活化域

<400> 13

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 14
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3Z 4 活化域

<400> 14

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
1 5 10 15

Val Leu Asp Lys Arg
20

<210> 15
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3Z 5 活化域

<400> 15

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
1 5 10 15

Ser Glu Ile Gly Met Lys

1113263429-0

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

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

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 18

<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3D 2 活化域

<400> 18

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Thr Ala Asp Thr Gln
85 90 95

Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
100 105 110

Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

115120125

<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3D 3 活化域

<400> 19

Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser
151015

His Leu Gly Gly Asn
20

<210> 20
<211> 206
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3E 1 活化域

<400> 20

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
151015

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
202530

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

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Met Ser
115 120 125

Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu
130 135 140

Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro
145 150 155 160

Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys
165 170 175

Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys

180185190

Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195200205

<210> 21
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3E 2 活化域

<400> 21

Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser
151015

Gly Leu Asn Gln Arg
20

<210> 22
<211> 182
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3G 1 活化域

<400> 22

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
151015

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
20 25 30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160

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

165170175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 23
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3G 2 活化域

<400> 23

Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser
15105

His Leu Gln Gly Asn
20

<210> 24
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD79A 1 活化域

<400> 24

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
15105

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
20 25 30

Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu
35 40 45

Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val
50 55 60

Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val
85 90 95

Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn
100 105 110

Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro
115 120 125

Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile
130 135 140

Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly
145 150 155 160

Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu

165170175

Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
180185190

Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly
195200205

Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu
210215220

Lys Pro
225

<210> 25
<211> 188
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD79A 2 活化域

<400> 25

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
151015

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
202530

Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu

35 40 45

Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val
50 55 60

Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Glu Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu
85 90 95

Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile
100 105 110

Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg
115 120 125

Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu Tyr
130 135 140

Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met
145 150 155 160

Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly
165 170 175

Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys Pro
180 185

<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD79A 3 活化域

<400> 26

Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu
1 5 10 15

Asp Ile Ser Arg Gly
20

<210> 27
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 DAP12 1 活化域

<400> 27

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
100 105 110

Lys

- <210> 28
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成的 DAP12 2 活化域

<400> 28

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp

20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Thr Arg Lys
65 70 75 80

Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln
85 90 95

Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln
100 105

<210> 29
<211> 102
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 DAP12 3 活化域

<400> 29

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu

20 25 30

Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu
35 40 45

Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala
50 55 60

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

Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr
85 90 95

Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys
100

<210> 30
<211> 101
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 DAP12 4 活化域

<400> 30

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu

20 25 30

Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu
35 40 45

Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala
50 55 60

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

Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln
85 90 95

Arg Pro Tyr Tyr Lys
100

<210> 31
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 DAP12 5 活化域

<400> 31

Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser
1 5 10 15

Asp Leu Asn Thr Gln

20

<210> 32
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 FCER1G 1 活化域

<400> 32

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
1 5 10 15

Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
20 25 30

Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
35 40 45

Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val
50 55 60

Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
65 70 75 80

His Glu Lys Pro Pro Gln
85

<210> 33

<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 FCER1G 2 活化域

<400> 33

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

Thr Leu Lys His Glu
20

<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 DAP10 活化域

<400> 34

Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met
1 5 10 15

Pro Gly Arg Gly
20

<210> 35
<211> 68
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 CD28 活化域

<400> 35

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
20 25 30

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
50 55 60

Ala Tyr Arg Ser
65

<210> 36

<211> 619

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 ZAP70 活化域

<400> 36

Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser

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

Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
180 185 190

Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
195 200 205

Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
210 215 220

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

Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
245 250 255

Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
260 265 270

His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn
275 280 285

Ser Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys
290 295 300

Pro Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser

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

Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe
465 470 475 480

Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg
485 490 495

Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn
500 505 510

Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
515 520 525

Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys
530 535 540

Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys
545 550 555 560

Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp
565 570 575

Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg
580 585 590

Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro
595 600 605

Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala

610

615

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 HA 抗原決定位

<400> 37

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 FLAG 抗原決定位

<400> 38

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 c-myc 抗原決定位

<400> 39

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 His5 親和體

<400> 40

His His His His His
1 5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 HisX6 親和體

<400> 41

His His His His His His
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Strep Tag 親和體

<400> 42

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 RYIRS 親和體

<400> 43

Arg Tyr Ile Arg Ser
1 5

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 FHHT 親和體

<400> 44

Phe His His Thr
1

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 親和體

<400> 45

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg
1 5 10 15

Ala

<210> 46
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD8 α 跨膜域

<400> 46

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> 47

<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD8 β 跨膜域

<400> 47

Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Val Ala Ile His Leu Cys Cys
20

<210> 48
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD4 跨膜域

<400> 48

Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly
1 5 10 15

Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys
20 25

<210> 49
<211> 23
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 CD3 ζ 跨膜域

<400> 49

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

Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
20

<210> 50

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 CD28 跨膜域

<400> 50

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 51

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 OX40 跨膜域

<400> 51

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro
1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
20 25

<210> 52
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD7 跨膜域

<400> 52

Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ala
20

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 1

<400> 53

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

<210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 2

<400> 54

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

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

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 3

<400> 55

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

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 4

<400> 56

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 5

<400> 57

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 6

<400> 58

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 7

<400> 59

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 8

<400> 60

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 連接子 9

<400> 61

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的鉸鏈 1

<400> 62

Cys Pro Pro Cys
1

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 鉸鏈 2

<400> 63

Asp Lys Thr His Thr
1 5

<210> 64

<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 3

<400> 64

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
1 5 10 15

<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 4

<400> 65

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
1 5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 5

<400> 66

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 6

<400> 67

Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 7

<400> 68

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 8

<400> 69

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 9

<400> 70

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 10

<400> 71

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

Pro

<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 11

<400> 72

Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln
1 5 10

<210> 73
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 銕鏈 12

<400> 73

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

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

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

<210> 74

<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD8 訊號肽

<400> 74

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

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 75
<211> 69
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD8 柄-TM

<400> 75

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

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
35 40 45

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
50 55 60

Ile Thr Leu Tyr Cys
65

<210> 76
<211> 66
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD28 柄-TM

<400> 76

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60

Trp Val
65

<210> 77
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 2A-1 裂解訊號

<400> 77

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> 78
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 eTAG 消除域

<400> 78

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 Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
195 200 205

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
210 215 220

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

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
325 330 335

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly

340 345 350

Ile Gly Leu Phe Met
355

<210> 79
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 4007V VH 條件活性 scFv

<400> 79

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

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

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

859095

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100105110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115120

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 4007V VL 條件活性 scFv

<400> 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Ser Ala
202530

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
354045

Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
505560

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

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Phe Glu Gly Val Trp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VL 條件活性 scFv

<400> 84

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Tyr Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 L3 4 條件活性 scFv

<220>
<221> X is T, I, or P
<222> (3)..(3)

<220>
<221> X is E or V
<222> (5)..(5)

<220>
<221> X is F or T

<222> (8)..(8)

<220>

<221> X 為 F 或 T

<222> (10)..(10)

<400> 85

Gln	Gln	Xaa	Asn	Xaa	Asp	Pro	Xaa	Thr	Xaa
1			5					10	

<210> 86

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 VL 5 條件活性 scFv

<400> 86

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

Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Arg	Tyr
			20					25					30		

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

Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Tyr	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
	50					55					60				

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 87
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 H1 1 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 T 或 W
<222> (1)..(1)

<220>
<221> X 為 H 或 A
<222> (3)..(3)

<400> 87

Xaa Gly Xaa Thr Met Asn
1 5

<210> 88
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ax1 H2 1 條件活性 scFv

<400> 88

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

Gly

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ax1 H31 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 H 或 D

<222> (2)..(2)

<220>

<221> X 為 E 或 H

<222> (4)..(4)

<220>

<221> X 為 E 或 F

<222> (7)..(7)

<400> 89

1113263429-0

<222> (3)..(3)

<220>

<221> X 為 H 或 D

<222> (6)..(6)

<400> 91

Trp Xaa Xaa Thr Arg Xaa Thr
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ax1 L3 1 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 T 或 P

<222> (6)..(6)

<220>

<221> X 為 T 或 R

<222> (9)..(9)

<400> 92

Gln Glu His Phe Ser Xaa Pro Leu Xaa
1 5

<210> 93

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ax1 WT VH 條件活性 scFv

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 94
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 WT VL 條件活性 scFv

<400> 94

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

$\langle 220 \rangle$

<221> X 為 T 或 S
<222> (1)..(1)

<400> 96

Xaa	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Asn
1				5					10		

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 H1 2 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 E 或 I
<222> (2)..(2)

<220>
<221> X 為 T 或 D
<222> (4)..(4)

<400> 97

Gly	Xaa	Asn	Xaa	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 98
<211> 16

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 H2 2 條件活性 scFv

<400> 98

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

<210> 99
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 H3 1 條件活性 scFv

<400> 99

Gly	Ser	Leu	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5				10				

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 H3 2 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 Y 或 G
<222> (6)..(6)

<400> 100

Phe Glu Gly Val Trp Xaa Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 L1 1 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 E 或 V
<222> (6)..(6)

<400> 101

Ser Ala Thr Ser Ser Xaa Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 102
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 L1 2 條件活性 scFv

<400> 102

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe Ile His
1 5 10 15

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 L2 1 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 G 或 H
<222> (1)..(1)

<400> 103

Xaa Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 L2 2 條件活性 scFv

<400> 104

Arg Thr Tyr Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 L3 1 條件活性 scFv

<400> 105

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 L3 2 條件活性 scFv

<400> 106

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 107

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 WT VH 條件活性 scFv

<400> 107

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp
35 40 45

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

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Phe Glu Gly Val Trp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 108
- <211> 60
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成的 Ax1 VL 1 條件活性 scFv

<400> 108

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

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

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

Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60

<210>	109
<211>	60
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 VL 2 條件活性 scFv

<400> 109

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

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

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

Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60

<210> 110
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 VL 3 條件活性 scFv

<400> 110

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

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

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

Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60

<210> 111
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 VL 4 條件活性 scFv

<400> 111

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

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

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

Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60

- <210> 112
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 VH 1 條件活性 scFv

<400> 112

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 113
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 VH 2 條件活性 scFv

<400> 113

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

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

202530

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
354045

Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
505560

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65707580

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
859095

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100105110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115120

- <210> 114
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ax1 VH 3 條件活性 scFv

<400> 114

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

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

- <210> 115
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的 Ror2 VH 1 條件活性 scFv

<400> 115

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

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

Thr Met His Trp Met Lys Gln Ser His Arg Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Thr Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Leu Tyr Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 VH 1 條件活性 scFv

<400> 116

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Glu Thr Glu Asp
20 25 30

Thr Asp His Trp Met Lys Gln Ser His Arg Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Glu Asn Asp Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala His Gly Ser Leu Tyr Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VH 3 條件活性 scFv

<400> 117

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Thr Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala His Gly Ser Leu Tyr Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 118
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VH 4 條件活性 scFv

<400> 118

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Thr Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala His Gly Ser Leu Tyr Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VH 5 條件活性 scFv

<400> 119

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Thr Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala His Gly Ser Leu Tyr Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 120
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VH 6 條件活性 scFv

<400> 120

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Ala Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Lys Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Phe Glu Gly Val Trp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 121
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VH 7 條件活性 scFv

<400> 121

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Ala Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Lys Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser His Phe Glu Gly Val Trp Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 122
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VL 1 條件活性 scFv

<400> 122

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 123
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VL 2 條件活性 scFv

<400> 123

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Glu Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 124
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 VL 3 條件活性 scFv

<400> 124

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 125
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的野生型 CD8 柄

<400> 125

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

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

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

<210> 126
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的野生型 CD28 柄

<400> 126

Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
1 5 10 15

Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
20 25 30

Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
35 40

<210> 127
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 CD3Z 7 活化域

<400> 127

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

15

10

5

1

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
85 90 95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
100 105 110

Arg

- <210> 128
- <211> 241
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 來自 F1-2-15 之合成的 scFv

<400> 128

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala

1113263429-0

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

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
165 170 175

Ser Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
180 185 190

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Tyr Asn Leu Glu
195 200 205

Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
210 215 220

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
245 250 255

Val Glu Ile Lys
260

- <210> 131
- <211> 260
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 來自 F1-1-23 之合成的 scFv

<400> 131

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Tyr Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
130 135 140

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

145

150

155

160

Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Thr Gly Glu Tyr Trp

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Phe

225

230

235

240

Glu Gly Val Trp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

245

250

255

Thr Val Ser Ser

260

<210> 132

<211> 260

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自 F1-1-15 之合成的 scFV

<400> 132

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Tyr Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
130 135 140

1113263429-0

<220>

<223> 合成的 IC-Δ CD137 雙共刺激域

<400> 133

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala
20 25 30

Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
35 40 45

Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
50 55 60

Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
65 70 75 80

Cys Glu Leu

<210> 134

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ax1 H1 2 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 T, A, 或 W
<222> (1)..(1)

<220>
<221> X 為 H 或 A
<222> (3)..(3)

<220>
<221> X 為 T 或 I
<222> (4)..(4)

<220>
<221> X 為 N 或 I
<222> (6)..(6)

<400> 134

Xaa Gly Xaa Xaa Met Xaa
1 5

<210> 135
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 H1 2 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 P 或 N
<222> (4)..(4)

<220>
<221> X 為 S, I, 或 T
<222> (10)..(10)

<400> 135

Leu Ile Lys Xaa Ser Asn Gly Gly Thr Xaa Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 136
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 H3 2 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 H, D, E, P, R, 或 W
<222> (2)..(2)

<220>
<221> X 為 Y 或 N
<222> (3)..(3)

<220>
<221> X 為 E, A, D, F, G, H, I, L, M, N, R, V, 或 Y
<222> (4)..(4)

<220>
<221> X 為 S, D, M, N, 或 Q
<222> (5)..(5)

<220>
<221> X 為 Y, C, E, 或 P

<222> (6)..(6)

<220>

<221> X 為 F, E, N, S, T, 或 V

<222> (7)..(7)

<220>

<221> X 為 A, D, G, L, 或 Y

<222> (8)..(8)

<220>

<221> X 為 M, E, 或 F

<222> (9)..(9)

<220>

<221> X 為 W, A, D, H, L, N, P, R, 或 T

<222> (12)..(12)

<220>

<221> X 為 G 或 H

<222> (13)..(13)

<400> 136

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Xaa Xaa
1 5 10

<210> 137

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ax1 L1 2 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 V, D, G, N, 或 W

$$\langle 222 \rangle \quad (6) \dots (6)$$
 $\langle 220 \rangle$

<221> X 為 S 或 V

$$\langle 222 \rangle \quad (7) \dots (7)$$
 $\langle 220 \rangle$

<221> X 為 A, L, 或 M

<222> (9) .. (9)

 $\langle 220 \rangle$

<221> X 為 A, D, N, 或 Q

$$\langle 222 \rangle \quad (11) \dots (11)$$

<400> 137

Lys Ala Ser Gln Asp Xaa Xaa Ser Xaa Val Xaa

1 5 10

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成的 Ax1 L2 2 條件活性 scFv

 $\langle 220 \rangle$

<221> X 為 W 或 F

$$\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (1)$$
 $\langle 220 \rangle$

<221> X 為 A, I, N, P, 或 Q

 $\langle 222 \rangle \quad (2) \dots (2)$

<220>
<221> X 為 S 或 D
<222> (3)..(3)

<220>
<221> X 為 H 或 D
<222> (6)..(6)

<400> 138

Xaa Xaa Xaa Thr Arg Xaa Thr
1 5

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ax1 L2 2 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 H, C, F, I, L, Q, S, T, V, 或 Y
<222> (3)..(3)

<220>
<221> X 為 F, C, D, E, G, N, 或 S
<222> (4)..(4)

<220>
<221> X 為 T, C, 或 P
<222> (6)..(6)

<220>
<221> X 為 P, A, C, D, E, H, K, S, T, V, 或 W
<222> (7)..(7)

<220>
<221> X 為 L, G, 或 R
<222> (8)..(8)

<220>
<221> X 為 T, I, 或 R
<222> (9)..(9)

<400> 139

Gln Glu Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 140
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 H1 3 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 F 或 E
<222> (4)..(4)

<220>
<221> X 為 Y 或 D
<222> (7)..(7)

<220>
<221> X 為 T 或 C
<222> (8)..(8)

<220>
<221> X 為 M, D, E, 或 Y

<222> (9)..(9)

<400> 140

Gly	Tyr	Thr	Xaa	Thr	Glu	Xaa	Xaa	Xaa	His
1				5					10

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 H1 4 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 Y, E, R, 或 T

<222> (8)..(8)

<400> 141

Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Thr	Gly	Xaa	Tyr	Trp	Asn
1				5						10

<210> 142

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 H2 3 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 G 或 S

<222> (1)..(1)

<220>

<221> X 為 I 或 E

<222> (2)..(2)

<220>

<221> X 為 N, C, L, 或 V

<222> (3)..(3)

<220>

<221> X 為 D 或 E

<222> (4)..(4)

<220>

<221> X 為 T, D, 或 E

<222> (4)..(4)

<400> 142

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5				10						15	

Gly

<210> 143

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 H2 4 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 K 或 N
<222> (8)..(8)

<400> 143

Tyr	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Xaa	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Asn
1				5					10					15	

<210> 144
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 H3 3 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 A, M, 或 T
<222> (1)..(1)

<220>
<221> X 為 R 或 H
<222> (2)..(2)

<220>
<221> X 為 G 或 E
<222> (3)..(3)

<220>
<221> X 為 L 或 F
<222> (5)..(5)

<220>
<221> X 為 S 或 G
<222> (7)..(7)

<220>
<221> X 為 G 或 D
<222> (9)..(9)

<220>
<221> X 為 N 或 E
<222> (10)..(10)

<220>
<221> X 為 D 或 L
<222> (14)..(14)

<220>
<221> X 為 Y, C, 或 T
<222> (15)..(15)

<220>
<221> X 為 W 或 L
<222> (16)..(16)

<400> 144

Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Xaa	Tyr	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Ser	Tyr	Phe	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10					15		

<210> 145
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 H3 4 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 R, G, H, W, 或 Y
<222> (3)..(3)

- <220>

<221> X 為 F, C, N, 或 Q

<222> (4)..(4)
- <220>

<221> X 為 E 或 S

<222> (5)..(5)
- <220>

<221> X 為 G, E, F, H, M, Q, 或 S

<222> (6)..(6)
- <220>

<221> X 為 W, A, I, P, Q, T, 或 V

<222> (8)..(8)
- <220>

<221> X 為 Y, G, N, 或 Q

<222> (9)..(9)
- <220>

<221> X 為 G, S, 或 T

<222> (10)..(10)
- <220>

<221> X 為 Y 或 I

<222> (13)..(13)
- <400>

145

Cys Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Leu Asp Xaa

1 5 10

- <210>

146
- <211>

10
- <212>

PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 L1 3 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 V 或 E

<222> (6)..(6)

<220>

<221> X 為 S 或 D

<222> (7)..(7)

<220>

<221> X 為 Y, C, 或 D

<222> (8)..(8)

<220>

<221> X 為 H, G, 或 L

<222> (10)..(10)

<400> 146

Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Met	Xaa
1				5					10

<210> 147

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 Ror2 L1 4 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 F, S, 或 T
<222> (13)..(13)

<400> 147

Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Arg	Tyr	Gly	Asn	Ser	Xaa	Ile	His
1				5					10				15	

<210> 148
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 L2 3 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 G, C, H, 或 P
<222> (1)..(1)

<400> 148

Xaa	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1			5			

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 L2 4 條件活性 scFv

<220>

<221> X 為 R, C, D, E, 或 W
<222> (1)..(1)

<220>
<221> X 為 N 或 D
<222> (4)..(4)

<400> 149

Xaa Thr Tyr Xaa Leu Glu Ser
1 5

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 L3 3 條件活性 scFv

<220>
<221> X 為 Q 或 E
<222> (2)..(2)

<220>
<221> X 為 R 或 H
<222> (3)..(3)

<220>
<221> X 為 S, D, G, I, Q, 或 V
<222> (5)..(5)

<220>
<221> X 為 T 或 D
<222> (9)..(9)

<220>
<221> X 為 F, D, 或 E
<222> (10)..(10)

<400> 150

Gln Xaa Xaa Ser Xaa Tyr Pro Phe Xaa Xaa
1 5 10

<210> 151
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 CAB3 VH

<400> 151

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

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

Thr Met His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Asp Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Leu Tyr Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 152
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 Ror2 CAB VL

<400> 152

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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 Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
145 150 155 160

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
165 170 175

Ser Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
180 185 190

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Tyr Asn Leu Glu
195 200 205

Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
210 215 220

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
245 250 255

Val Glu Ile Lys
260

<210> 154
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自 F1-1-17 之合成的 scFV

<400> 154

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

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

Glu Tyr Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp
35 40 45

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

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Phe Glu Gly Val Trp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

Glu Ser Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Tyr Asn Leu
180 185 190

Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
195 200 205

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

Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Lys Val Glu Ile Lys
245

<400> 155

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
115 120 125

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
130 135 140

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Ile Arg Gln
145 150 155 160

Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Gly Ile Asn Asp Asn Asn
165 170 175

Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
195 200 205

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Leu Tyr Ser
210 215 220

Tyr Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser

<400> 156

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
130 135 140

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
145 150 155 160

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Ile Arg Gln Ser
165 170 175

Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Gly Ile Asn Asp Asn Asn Gly
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
195 200 205

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
210 215 220

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Leu Tyr Ser Tyr
225 230 235 240

Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
245 250 255

Ser Ser

<210> 157
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自 F1-1-9 之合成的 scFV

<400> 157

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp
35 40 45

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

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser His Phe Glu Gly Val Trp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

Glu Ser Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Tyr Asn Leu
180 185 190

Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
195 200 205

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

Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Lys Val Glu Ile Lys
245

<210> 158
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自 F1-1-21 之合成的 scFV

<400> 158

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Tyr Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
115 120 125

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

Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Thr Gly Glu Tyr
145 150 155 160

Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Lys Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
180 185 190

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

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
210 215 220

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

Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 159

<211> 257

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自 F1-2-3 之合成的 scFV

<400> 159

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
145 150 155 160

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
165 170 175

Gln Asp Val Val Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
180 185 190

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val
195 200 205

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
210 215 220

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu
225 230 235 240

His Phe Ser Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
245 250 255

Lys

<210> 160
<211> 242
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自 F1-2-8 之合成的 scFV

<400> 160

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

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

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

Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Pro Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln
115 120 125

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys
130 135 140

Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Trp Gly Ala Thr Met Asn Trp Ile Arg
145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Lys Pro Ser
165 170 175

Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile
180 185 190

Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu
195 200 205

Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala His Gly His Tyr Glu
210 215 220

Ser Tyr Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 161
<211> 257

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自 F1-2-10 之合成的 scFV

<400> 161

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

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

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

Tyr Trp Gln Asp Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Pro Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
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 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser
130 135 140

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys
145 150 155 160

Val Ser Gly Tyr Ser Phe Trp Gly Ala Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln
165 170 175

Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn
180 185 190

Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser
195 200 205

Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys
210 215 220

Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala His Gly His Tyr Glu Ser
225 230 235 240

Tyr Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255

Ser

申請專利範圍

1. 一種用於結合Ax1之嵌合抗原受體，包含：

a) 抗原特異性靶向區 (ASTR)，其中結合至Ax1之該抗原特異性靶向區 (ASTR) 包括重鏈可變區，該重鏈可變區包括具有H1序列、H2序列及H3序列的三個互補決定區；其中：

i) 該H1序列是X₁GX₂TMN (SEQ ID NO:87)；

ii) 該H2序列是LIKPSNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:88)；

iii) 該H3序列是GX₃YX₄SYX₅AMDY (SEQ ID NO:89)；

其中X₁是W，X₂是A，X₃是H，X₄是E，及X₅是E；或者X₁是T，X₂是H，X₃是H，X₄是E，及X₅是F；且

其中結合至Ax1之該抗原特異性靶向區 (ASTR) 進一步包括輕鏈可變區，該輕鏈可變區包括具有L1序列、L2序列及L3序列的三個互補決定區；其中：

iv) 該L1序列是KASQDVX₆SAVA (SEQ ID NO:90)；

v) 該L2序列是WX₇X₈TRX₉T (SEQ ID NO:91)；及

vi) 該L3序列是QEHFSX₁₀PLX₁₁ (SEQ ID NO:92)，

其中X₆是V，X₇是Q，X₈是D，X₉是H，X₁₀是P，及X₁₁是T；或者X₆是S，X₇是A，X₈是S，X₉是H，X₁₀是T，及X₁₁是T；

b) 跨膜域；及

c) 胞內活化域，其中該跨膜域位於該抗原特異性靶向區 (ASTR) 與該胞內活化域之間。

2. 如請求項1所記載之嵌合抗原受體，其中該抗原特異性靶向區（ASTR）作為包含SEQ ID NO:79之抗體重鏈可變區及SEQ ID NO:80之抗體輕鏈可變區的單鏈可變抗體片段結合至Ax1之相同抗原決定位。
3. 如請求項1所記載之嵌合抗原受體，其中該重鏈可變區包括SEQ ID NO:79之胺基酸序列。
4. 如請求項1所記載之嵌合抗原受體，其中該輕鏈可變區包括SEQ ID NO:80之胺基酸序列。
5. 如請求項4所記載之嵌合抗原受體，其中該重鏈可變區包括SEQ ID NO:79之胺基酸序列。
6. 如請求項1至5中任一項所記載之嵌合抗原受體，其中該重鏈可變區及該輕鏈可變區藉由連接子分離，其中該連接子的長度在6個與100個胺基酸之間。
7. 如請求項1至5中任一項所記載之嵌合抗原受體，其中該嵌合抗原受體進一步包括柄域及共刺激域，且其中該嵌合抗原受體包括自胺基末端至羧基末端、該抗原特異性靶向區（ASTR）、該柄域、該跨膜域、該共刺激域及該胞內活化域，

其中該柄域為CD8柄域或CD28柄域，

其中該跨膜域為CD8跨膜域或CD28跨膜域，

其中該共刺激域為CD137共刺激域、IC Δ 共刺激域、CD28共刺激域，或包括IC Δ 共刺激域和CD137共刺激域兩者，且

其中該胞內活化域為CD3Z活化域。

8. 如請求項7所記載之嵌合抗原受體，其中該柄域為CD28柄域，其中該跨膜域為CD28跨膜域，且其中該共刺激域為IC Δ

共刺激域。

9. 如請求項1至5中任一項所記載之嵌合抗原受體，其中X₁是W，X₂是A，X₃是H，X₄是E，X₅是E，X₆是V，X₇是Q，X₈是D，X₉是H，X₁₀是P，及X₁₁是T。
10. 如請求項1至5中任一項所記載之嵌合抗原受體，其中X₁是T，X₂是H，X₃是H，X₄是E，X₅是F，X₆是S，X₇是A，X₈是S，X₉是H，X₁₀是T，及X₁₁是T。
11. 如請求項1至5中任一項所記載之嵌合抗原受體，其中該抗原特異性靶向區（ASTR）為選自scFv、Fab片段、Fab' 片段、(Fab')2片段、Fv片段及二價單鏈抗體或雙抗體之抗體。
12. 一種經分離之重組T細胞，包括基因組，該基因組包括可操作地連接至在T細胞中有活性之啟動子的核酸序列，其中該核酸序列編碼如請求項1至5中任一項所記載之嵌合抗原受體。
13. 一種載體，包括可操作地連接至在T細胞中有活性之啟動子的核酸序列，其中該核酸序列編碼如請求項1至5中任一項所記載之嵌合抗原受體。
14. 一種在體外活化T細胞的方法，包括使目標哺乳動物細胞與在低於pH為7.0下的T細胞接觸，其中該目標哺乳動物細胞表現Ax1，且其中該T細胞表現如請求項1至5中任一項所記載之嵌合抗原受體。
15. 如請求項14所記載之方法，其進一步包括在該接觸之前，用在其基因組中編碼該嵌合抗原受體的非複製勝任型重組反轉錄病毒顆粒轉導該T細胞，以基因修飾該T細胞。

圖式

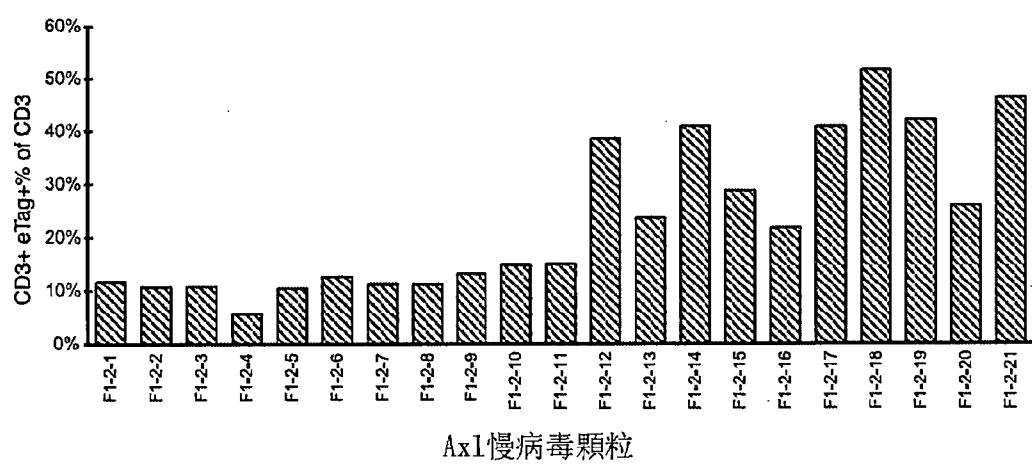


圖 1

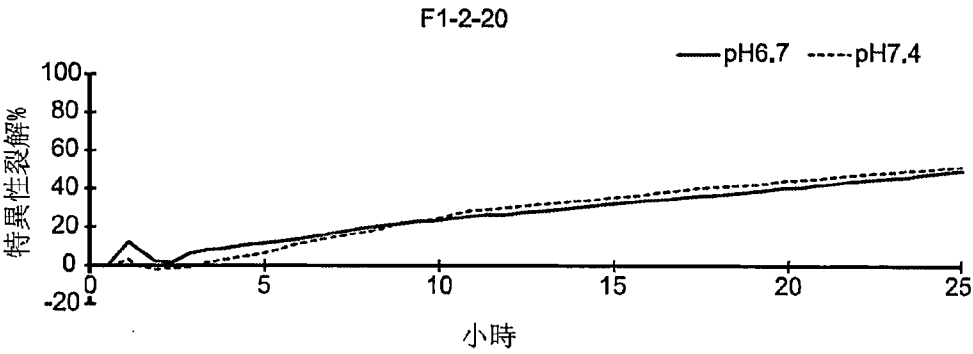


圖 2A

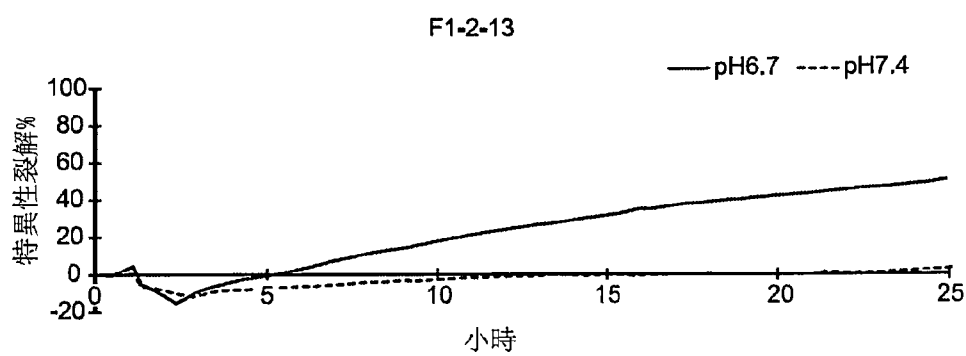


圖 2B

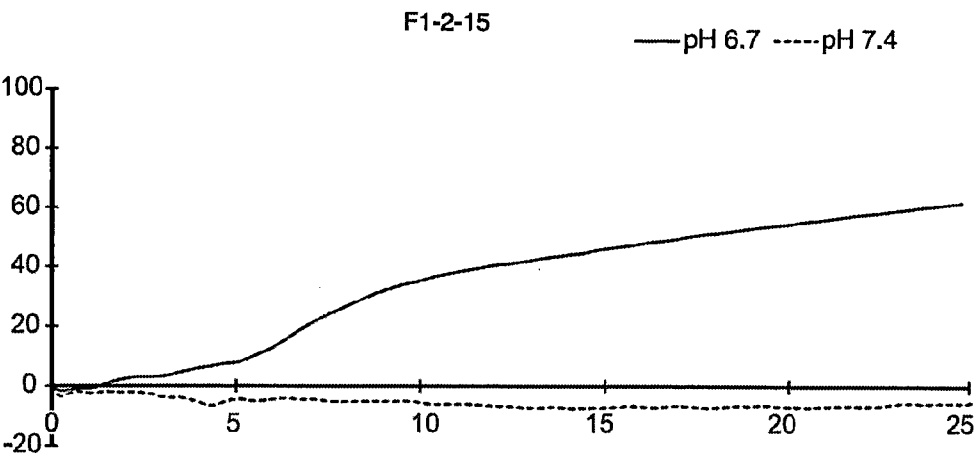


圖 2C

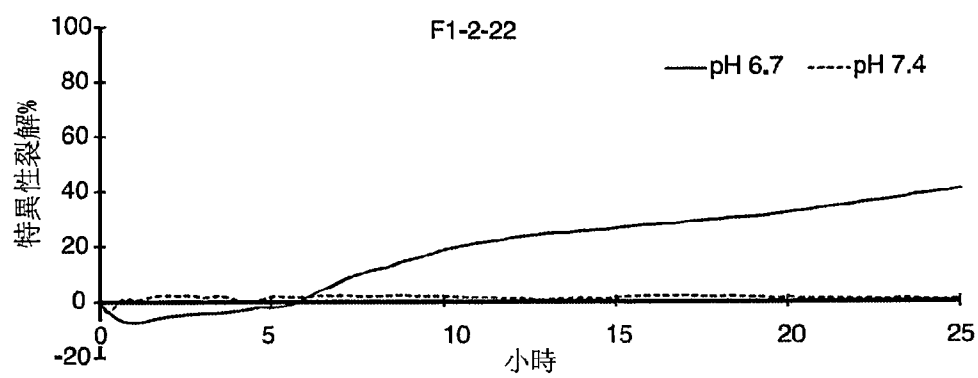


圖 2D

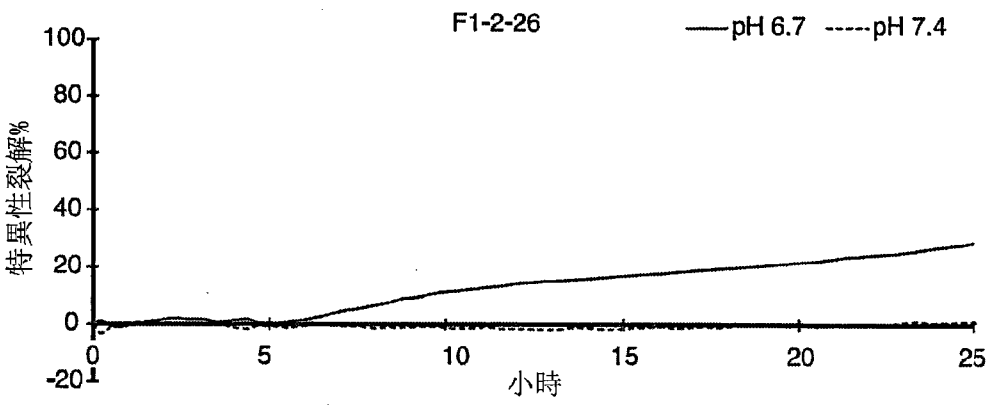


圖 2E

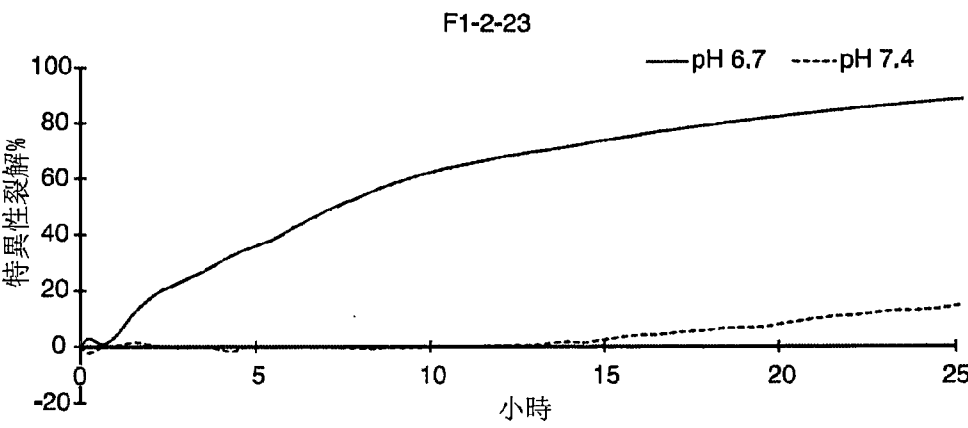


圖 2F

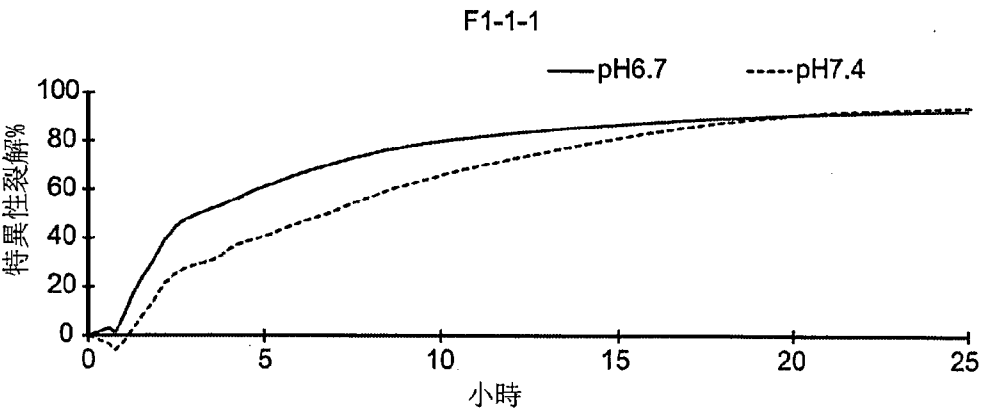


圖 3A

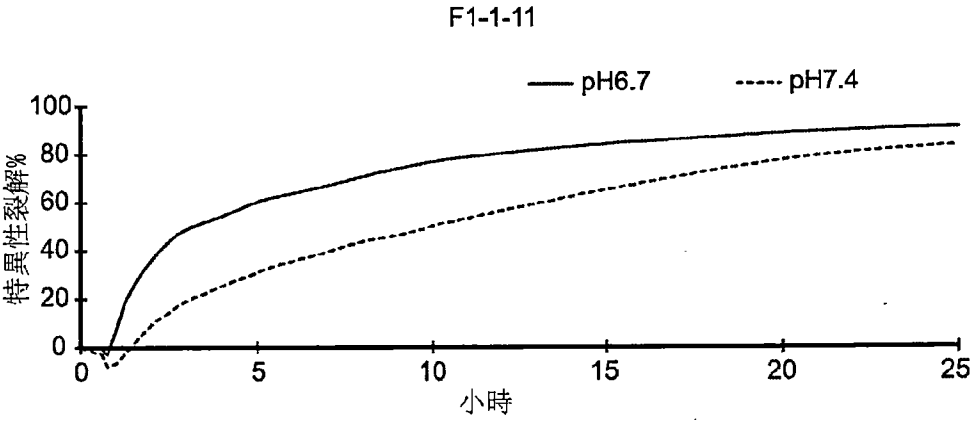


圖 3B

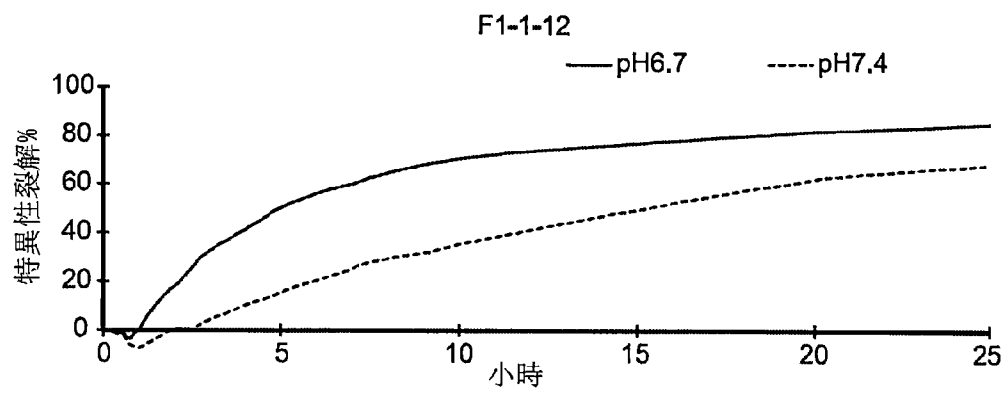


圖 3C

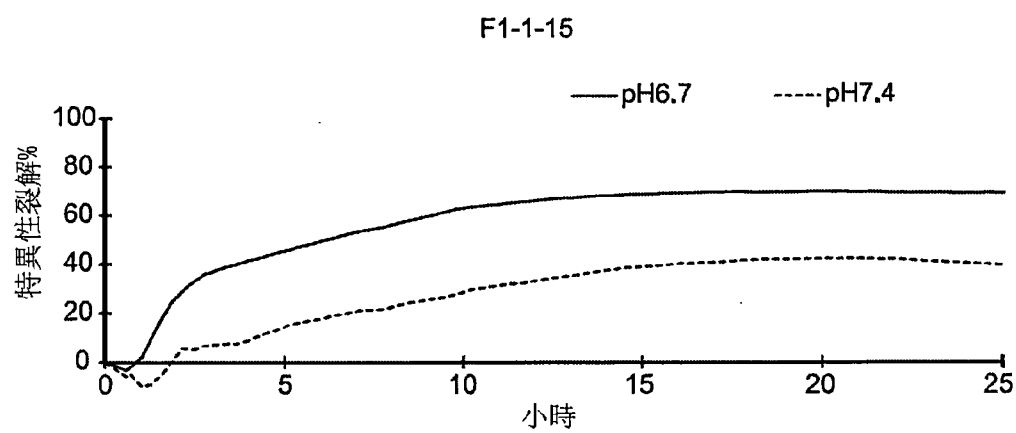


圖 3D

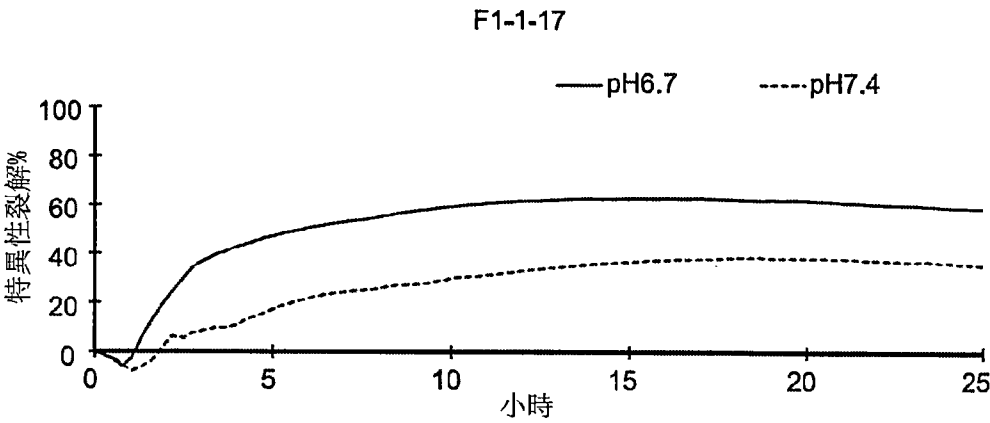


圖 3E

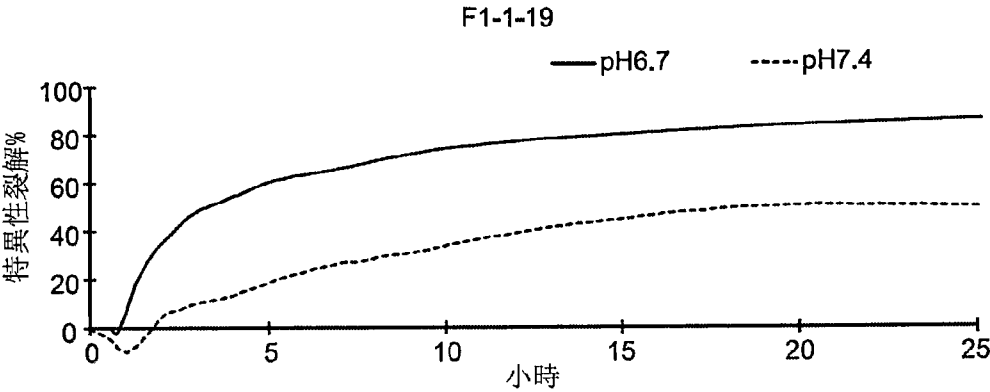


圖 3F

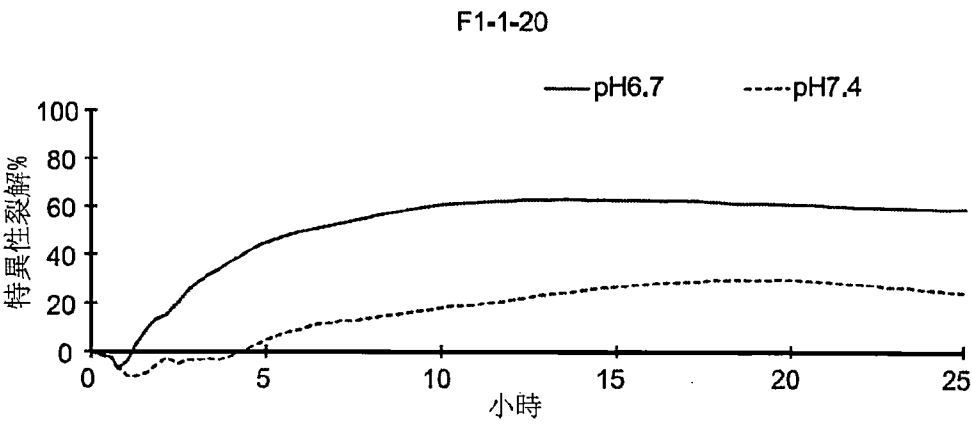


圖 3G

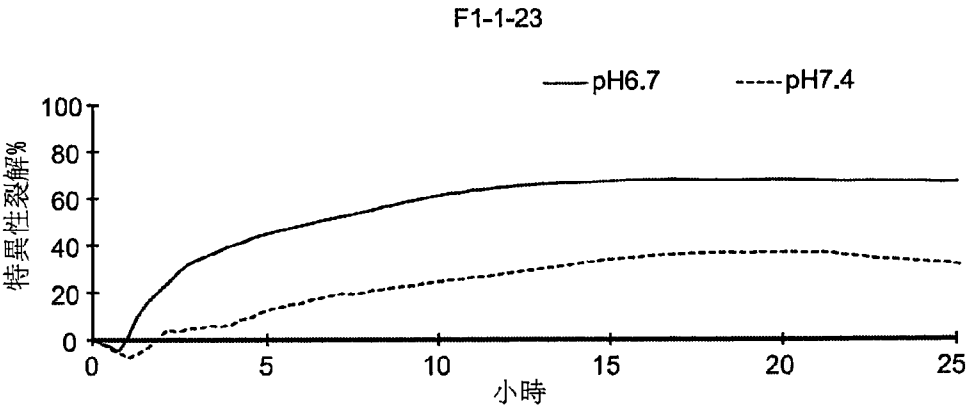


圖 3H

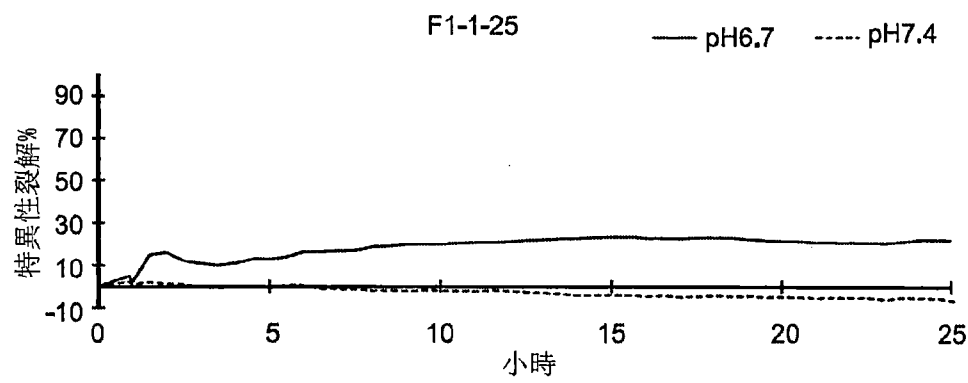


圖 3I

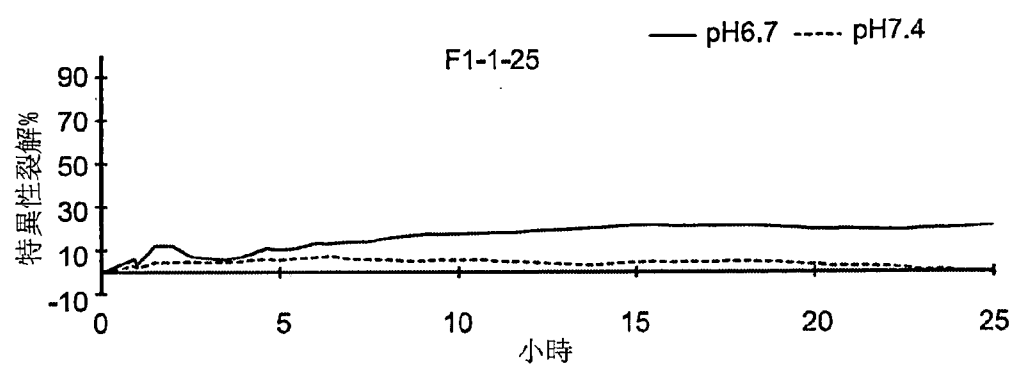


圖 3J

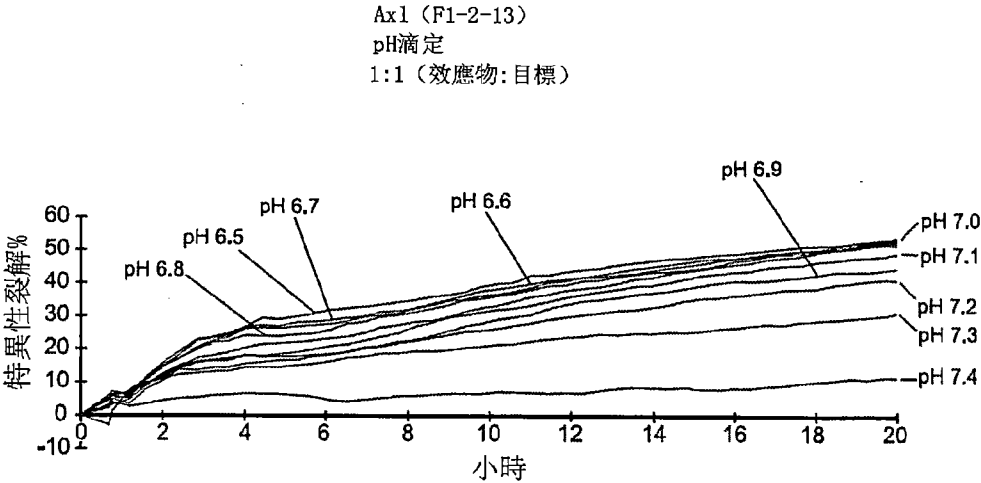


圖 4A

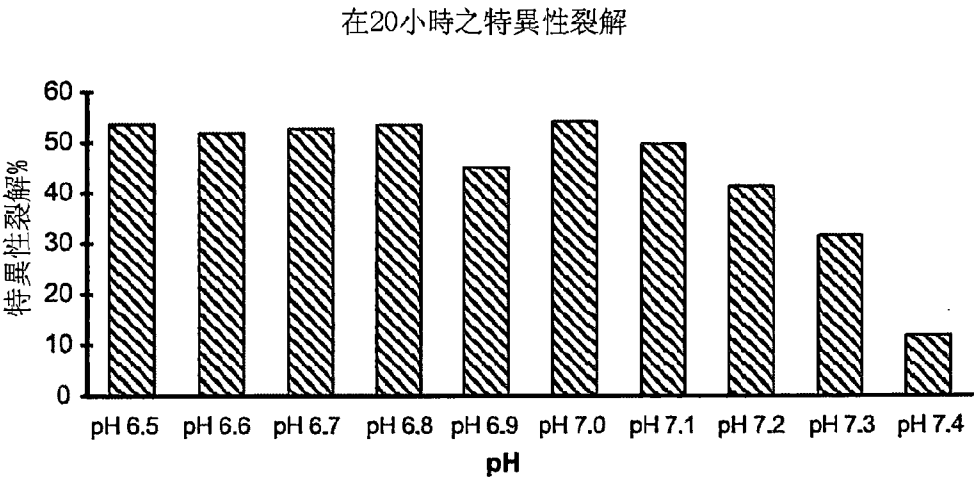


圖 4B

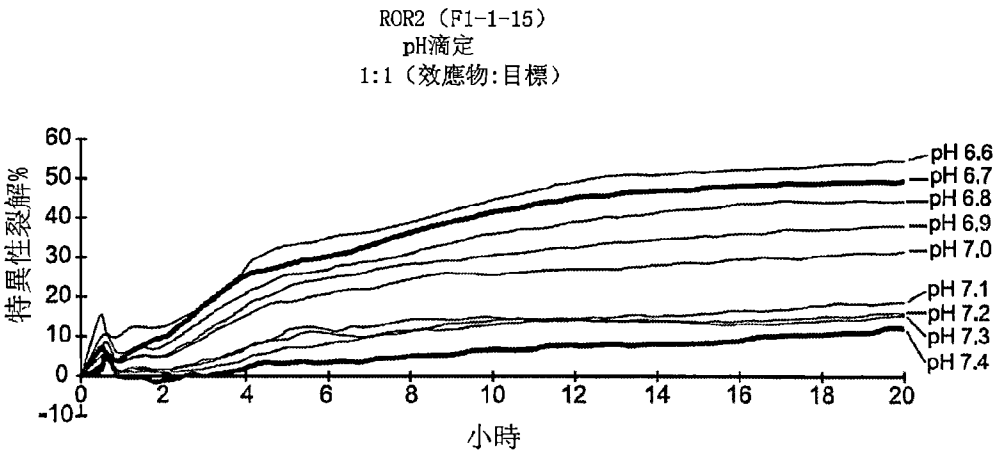


圖 5A

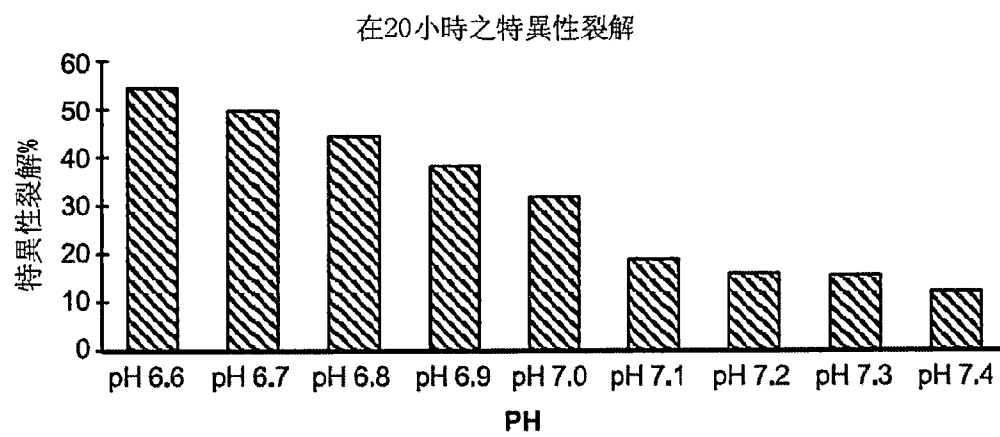


圖 5B

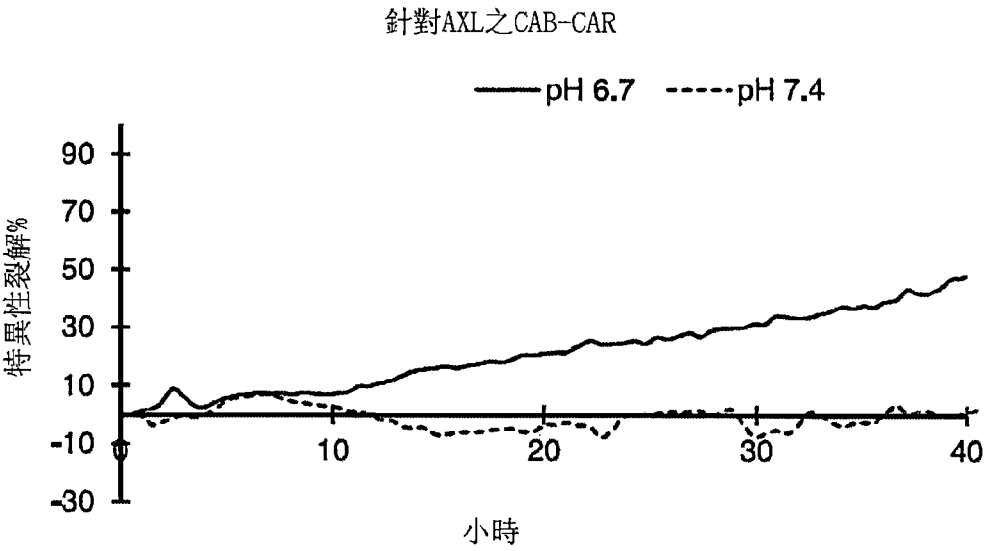


圖 6A

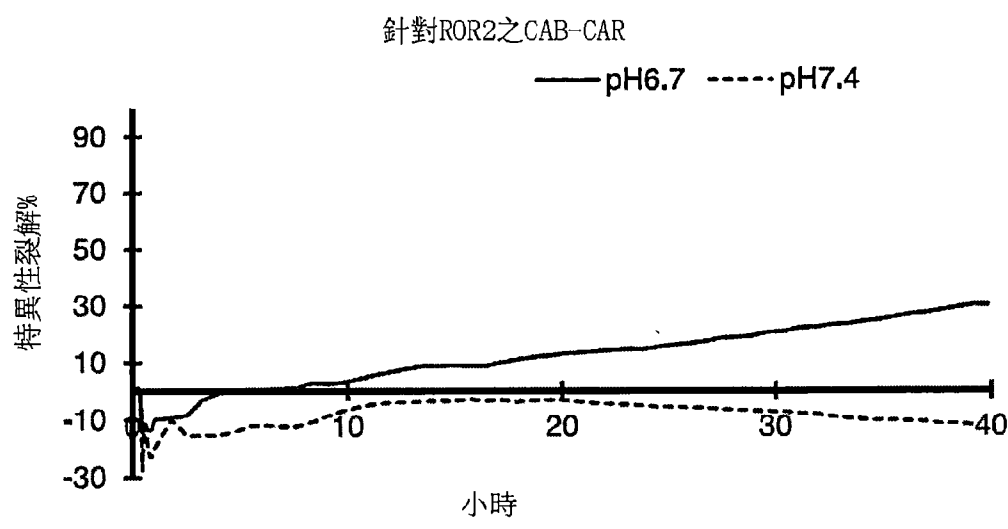


圖 6B

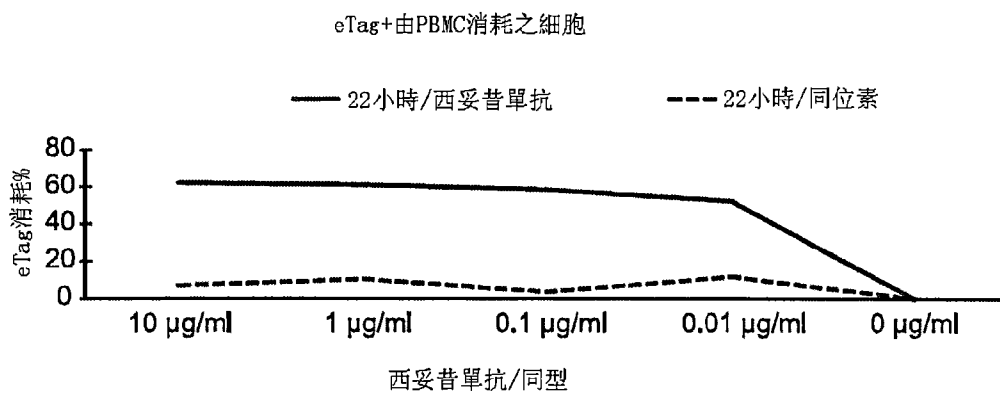


圖 7A

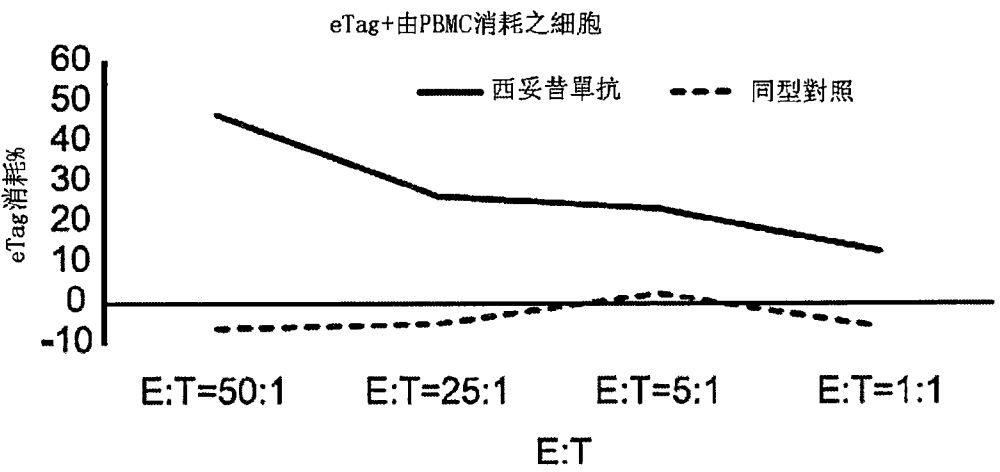


圖 7B

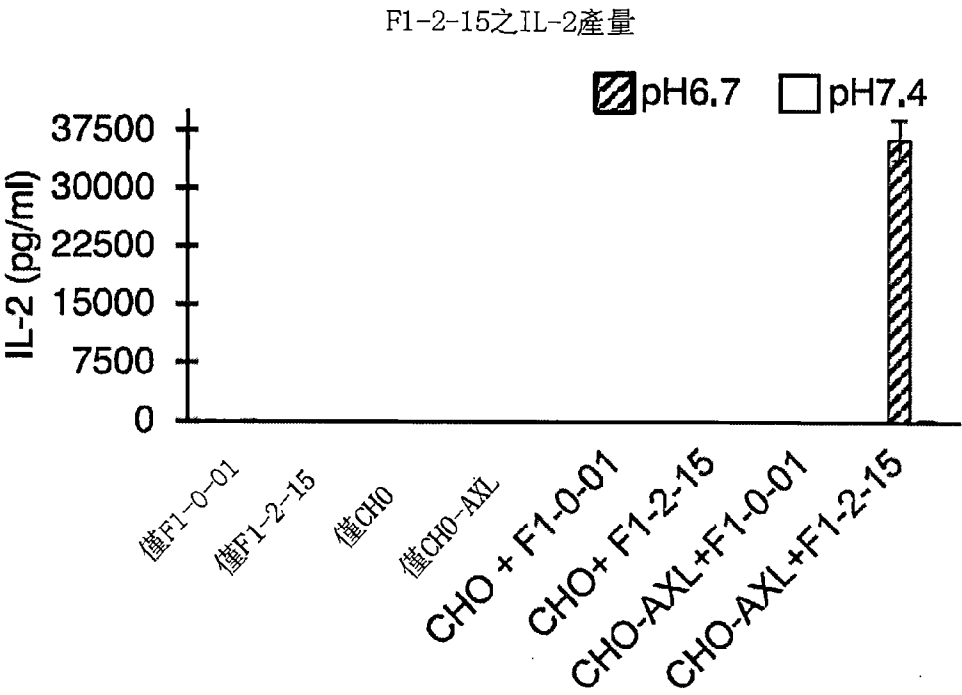


圖 8A

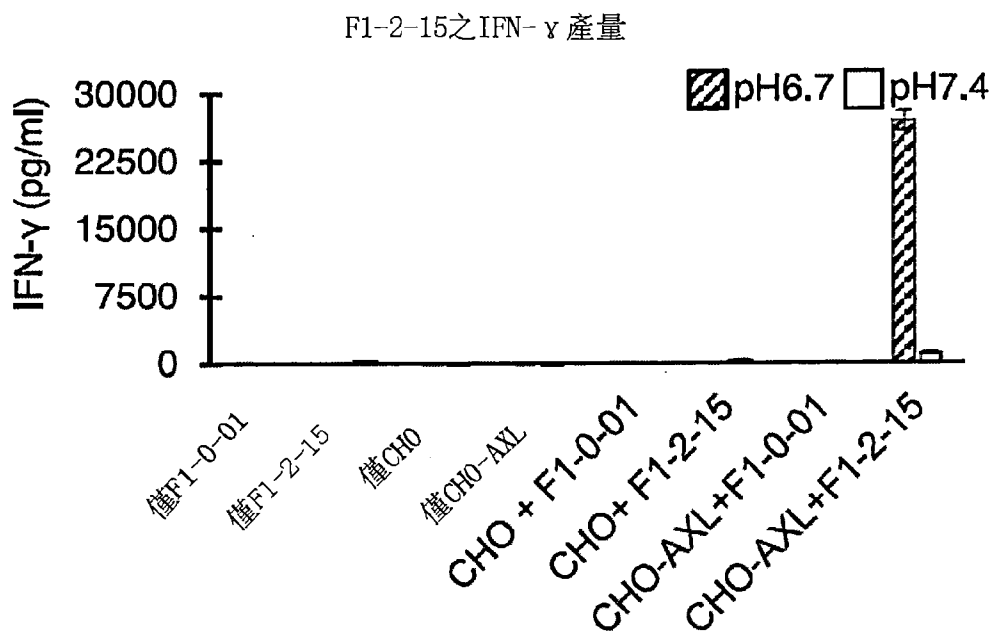


圖 8B

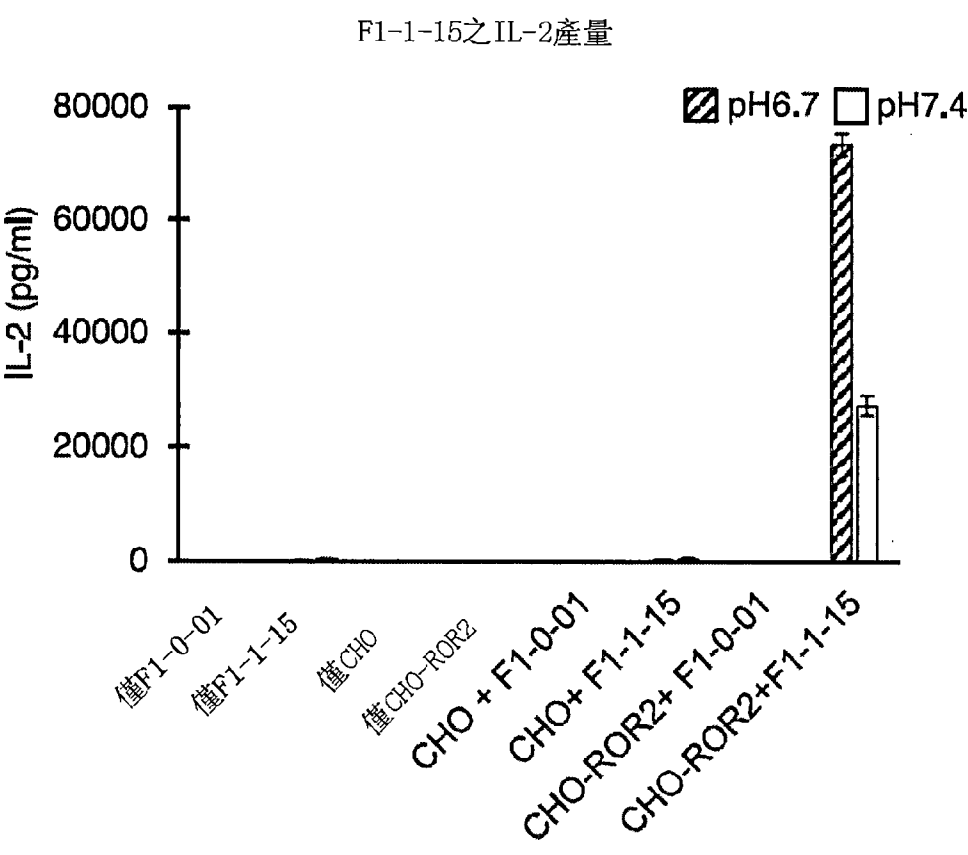


圖 8C

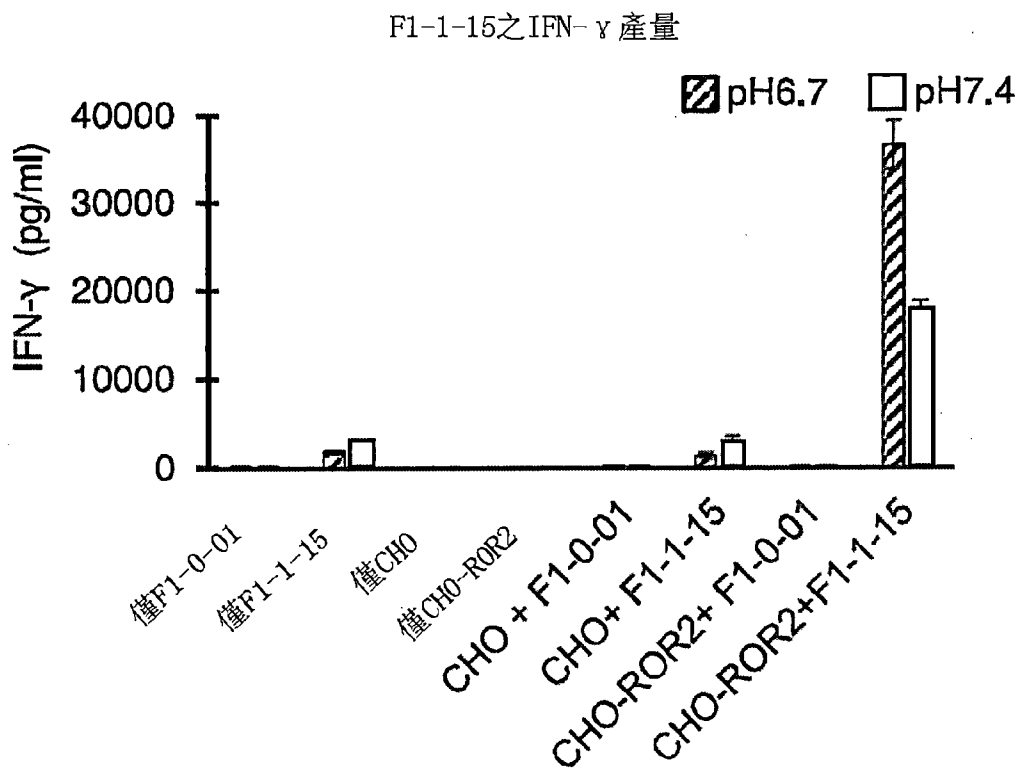


圖 8D

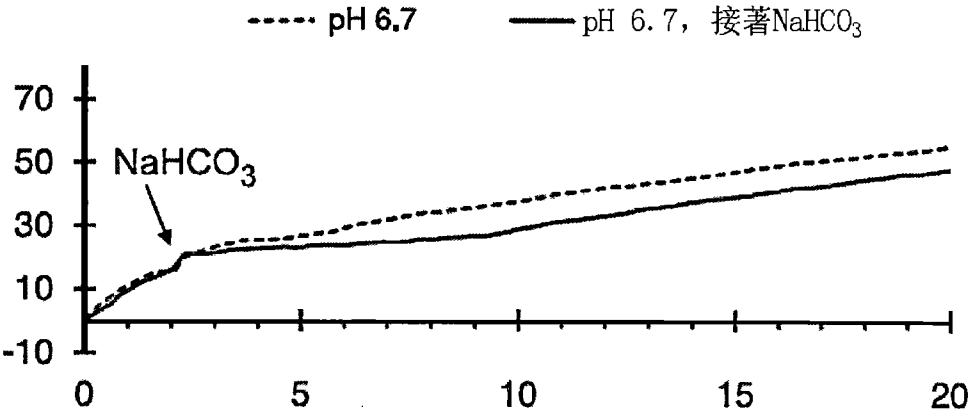


圖 9A

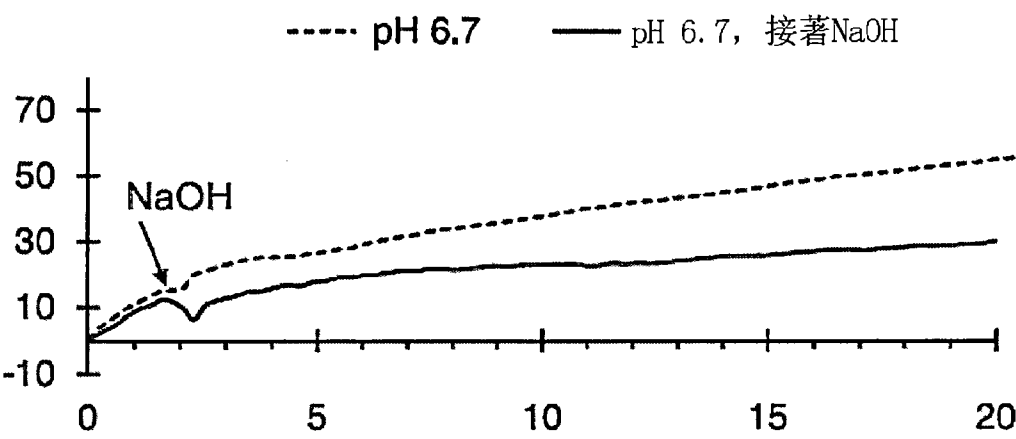


圖 9B

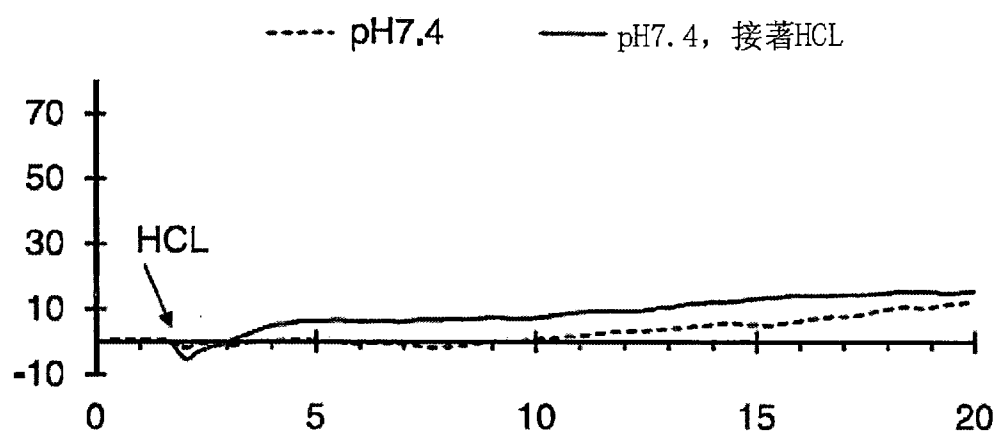


圖 9C

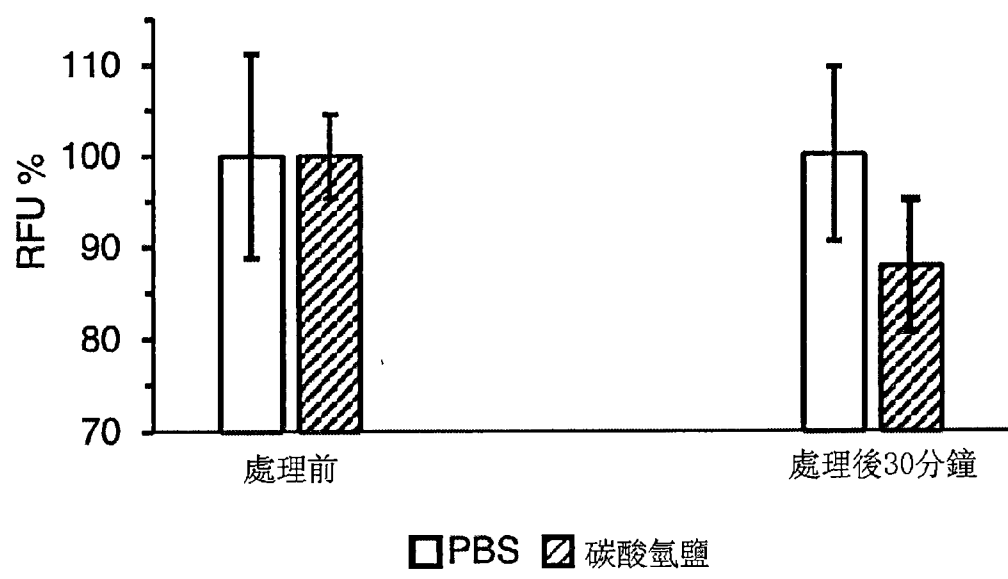


圖 10

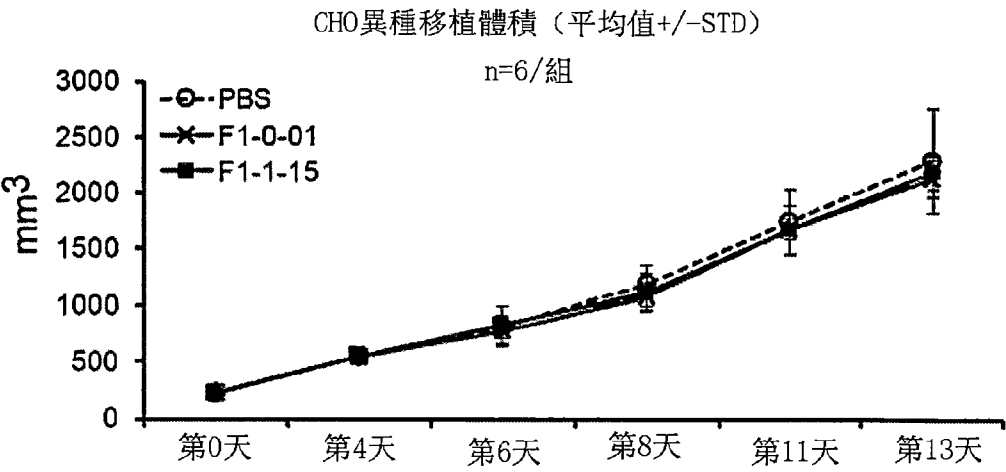


圖 11A

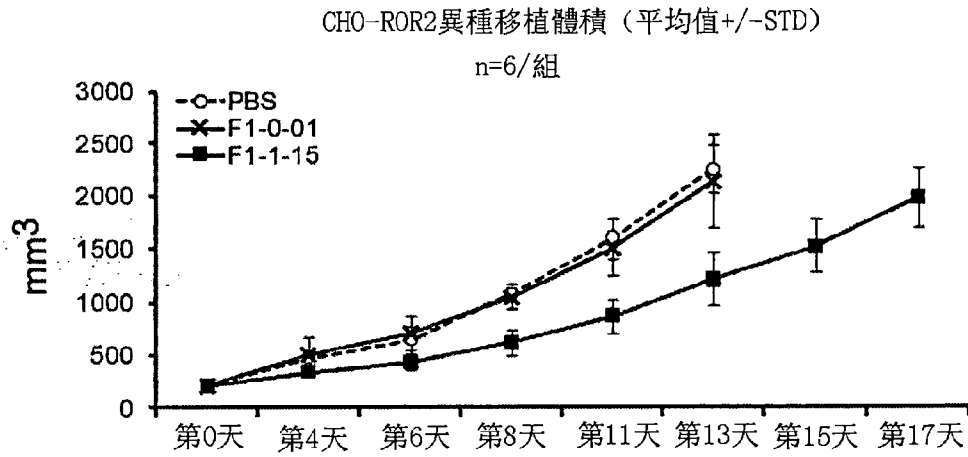


圖 11B

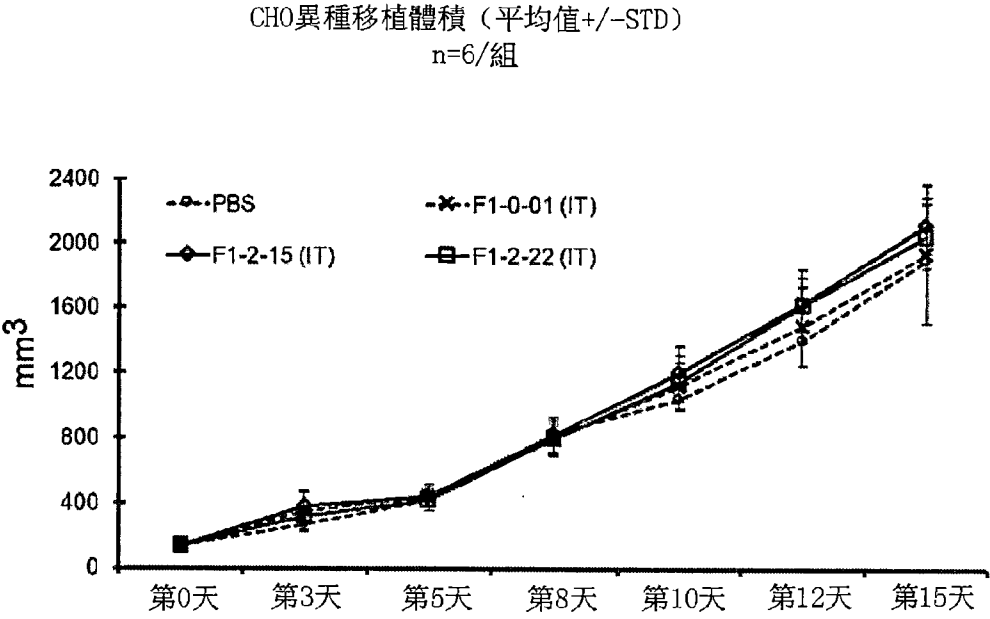


圖 12A

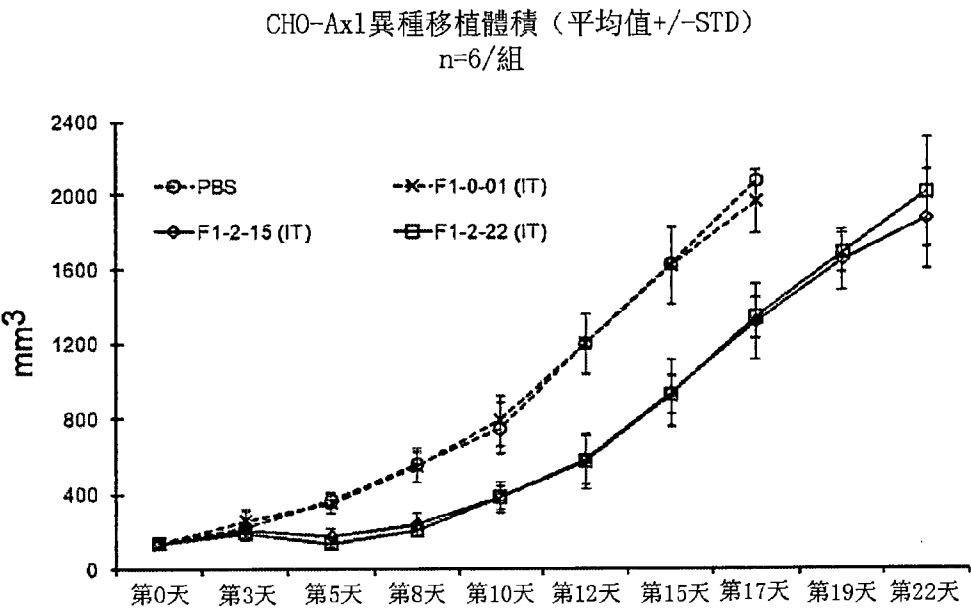


圖 12B

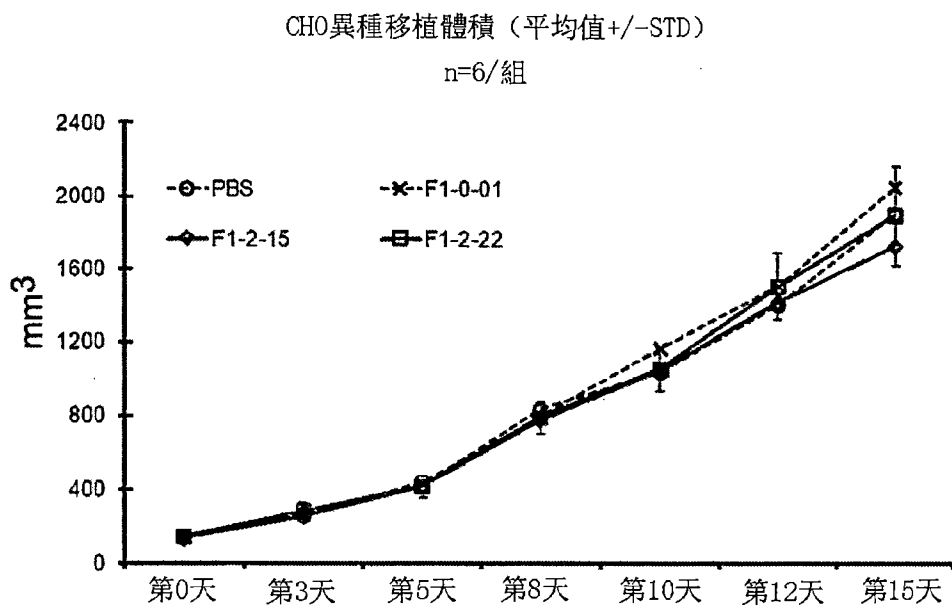


圖 13A

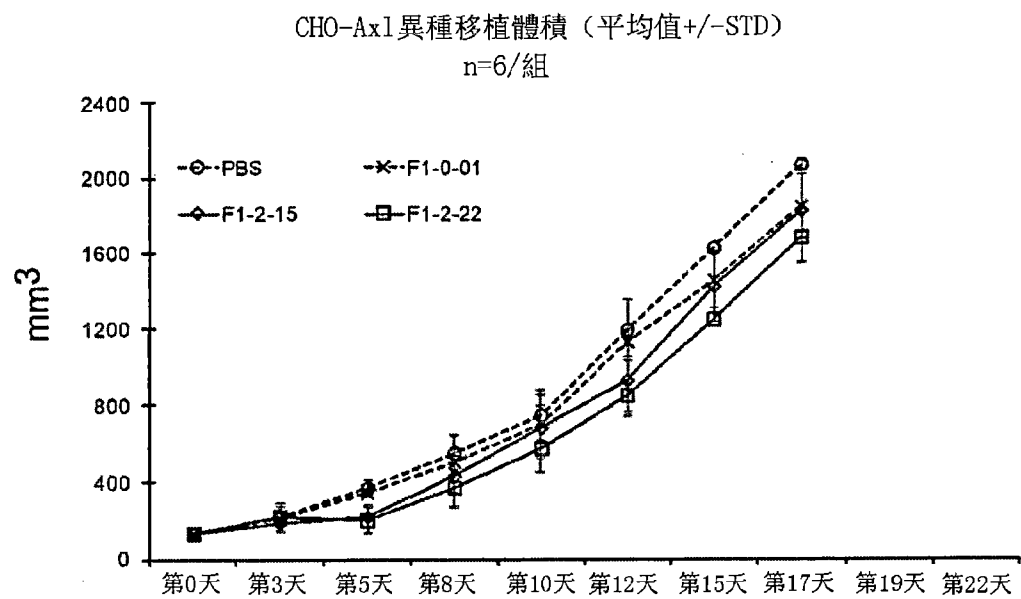


圖 13B

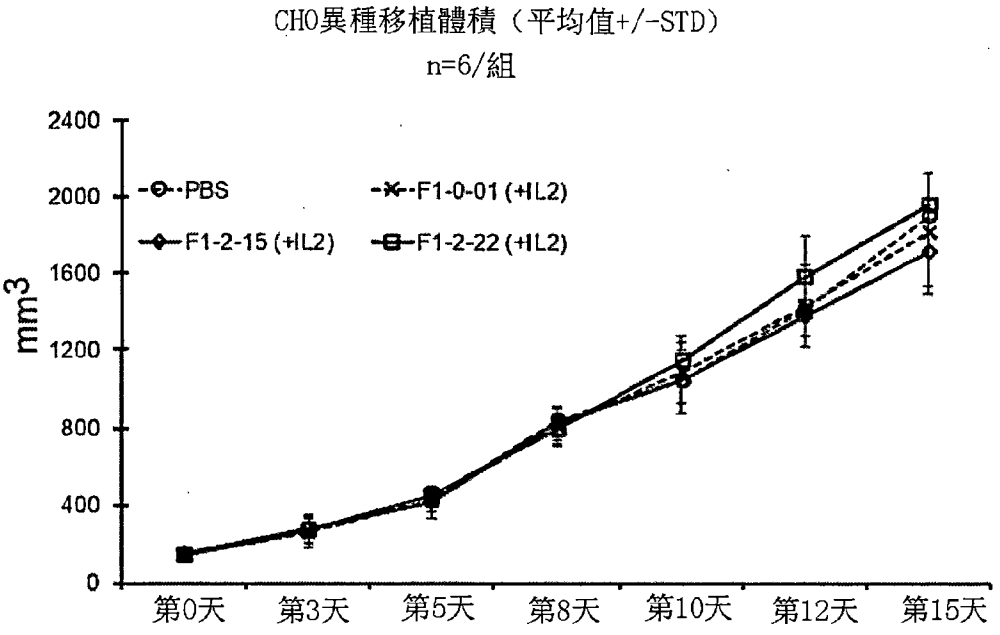


圖 14A

CHO-Ax1異種移植體積 (平均值 $\pm$ STD)
n=6/組

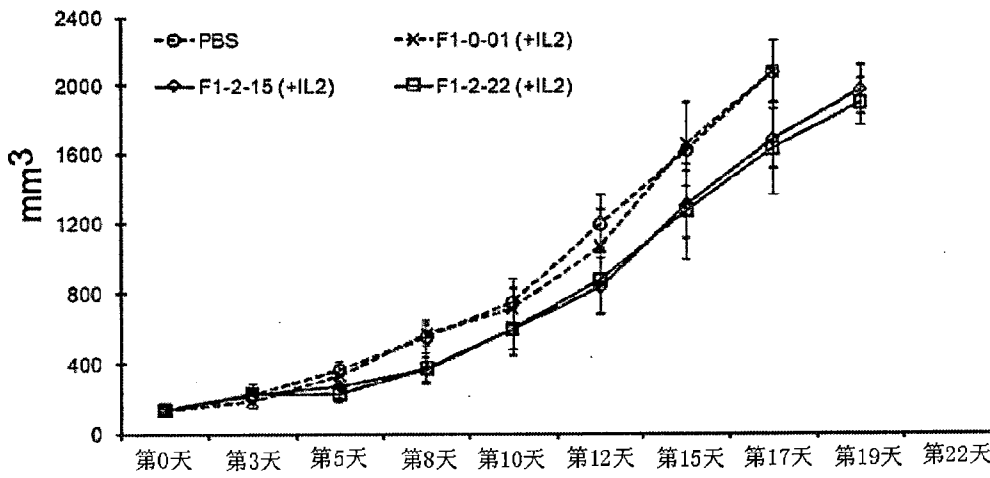


圖 14B