



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112912105 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 16

(21) 申请号 201980066246.X

(22) 申请日 2019.08.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112912105 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(30) 优先权数据
18306153.0 2018.08.31 EP
19305809.6 2019.06.21 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/073257 2019.08.30

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/043899 EN 2020.03.05

(73) 专利权人 因维克蒂斯股份有限公司
地址 法国巴黎

(72) 发明人 M·卢斯托 F·安纳

P·朗格拉德德莫延 J·科马丹

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 李程达

(51) Int.Cl.
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(56) 对比文件
EP 2730588 A1, 2014.05.14
WO 2016160622 A2, 2016.10.06

审查员 李娟娟

权利要求书2页 说明书64页
序列表54页 附图12页

(54) 发明名称

针对多种HLA-G同种型的嵌合抗原受体

(57) 摘要

本发明涉及针对多种但不是全部人白细胞抗原 (HLA-G) 同种型的嵌合抗原受体 (CAR)。更具体地, 本发明涉及分别特异于无 β 2M 或与 β 2M 缔合的 HLA-G 的免疫抑制同种型的 CAR。

1. 抗人白细胞抗原G (HLA-G) 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区 (VH), 其包含SEQ ID NO:5的重链互补决定区1 (HC CDR1)、SEQ ID NO:6的重链互补决定区2 (HC CDR2) 和SEQ ID NO:7的重链互补决定区3 (HC CDR3); 和

(b) 轻链可变区 (VL), 其包含SEQ ID NO:8的轻链互补决定区1 (LC CDR1)、SEQ ID NO:9的轻链互补决定区2 (LC CDR2) 和SEQ ID NO:10的轻链互补决定区3 (LC CDR3)。

2. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述VH由SEQ ID NO:1组成, 以及所述VL由SEQ ID NO:2组成。

3. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段是人源化的或嵌合的。

4. 根据权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段缀合至毒性剂。

5. 根据权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段是scFv、Fv、Fab、Fab'或F(ab')₂。

6. 根据权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体是单克隆抗体。

7. 嵌合抗原受体 (CAR), 其包含:

(a) 细胞外结构域, 所述细胞外结构域包含特异性结合HLA-G的抗原结合结构域, 其中所述抗原结合结构域包含:

(i) VH, 其包含SEQ ID NO:5的重链互补决定区1 (HC CDR1)、SEQ ID NO:6的重链互补决定区2 (HC CDR2) 和SEQ ID NO:7的重链互补决定区3 (HC CDR3); 和

(ii) VL, 其包含SEQ ID NO:8的轻链互补决定区1 (LC CDR1)、SEQ ID NO:9的轻链互补决定区2 (LC CDR2) 和SEQ ID NO:10的轻链互补决定区3 (LC CDR3);

(b) 跨膜结构域; 和

(c) 细胞内信号传导结构域。

8. 根据权利要求7所述的CAR, 其中所述VH由SEQ ID NO:1组成, 以及所述VL由SEQ ID NO:2组成。

9. 根据权利要求7或8所述的CAR, 其中所述抗原结合结构域是scFv。

10. 根据权利要求9所述的CAR, 其中所述抗原结合结构域由SEQ ID NO:31组成。

11. 根据权利要求7或8所述的CAR, 其中所述跨膜结构域是CD28跨膜结构域; 并且其中所述细胞内信号传导结构域包含4-1BB共刺激信号传导区和CD3ζ胞内结构域。

12. 根据权利要求11所述的CAR, 其中:

所述CD28跨膜结构域由SEQ ID NO:20组成;

所述4-1BB共刺激信号传导区由SEQ ID NO:21组成; 以及

所述CD3ζ胞内结构域由SEQ ID NO:22组成。

13. 根据权利要求11所述的CAR, 其中所述细胞内信号传导结构域还包含CD28共刺激结构域。

14. 根据权利要求7或8所述的CAR, 其还包含连接所述抗原结合结构域与所述跨膜结构域的铰链结构域。

15. 根据权利要求14所述的CAR, 其中所述铰链结构域是: (i) 人IgG4铰链结构域, (ii)

人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域, (iii) 突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域, (iv) CD28铰链或(v) CD8a铰链结构域。

16. 根据权利要求7或8所述的CAR, 其中所述CAR由SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:85组成。

17. 核酸分子, 其编码权利要求7或8所述的CAR。

18. 表达载体, 其包含权利要求17所述的核酸分子。

19. 包含权利要求17所述的核酸分子的细胞。

20. 包含权利要求18所述的表达载体的细胞。

21. 包含权利要求7或8所述的CAR的细胞。

22. 根据权利要求21所述的细胞, 其中所述细胞是T细胞、B细胞、NK细胞、NKT细胞、单核细胞或树突状细胞。

23. 药物组合物, 其包含根据权利要求20所述的细胞以及药学上可接受的承载体。

24. 根据权利要求21所述的细胞, 其用于癌症的治疗。

25. 根据权利要求23所述的药物组合物, 其用于癌症的治疗。

针对多种HLA-G同种型的嵌合抗原受体

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学、细胞生物学和分子生物学领域。在某些方面,本发明的领域涉及免疫疗法。更具体地,本发明涉及针对多种人白细胞抗原 (HLA-G) 同种型的嵌合抗原受体 (CAR)。

背景技术

[0002] 多年来,癌症治疗的基础是手术、化学疗法和放射疗法。但是,在过去的几年中,免疫疗法已成为癌症治疗的有效工具。

[0003] 基因工程的进步导致了合成的肿瘤靶向受体 (称为嵌合抗原受体 (CAR)) 的设计,该受体可以被引入到人免疫细胞 (例如T细胞) 中,以重定向抗原特异性并增强效应免疫细胞的功能。CAR最早是在1980年代中期开发的,此后人们对这些受体的兴趣不断增长。它们首先被产生以通过独立于HLA-肽复合物提供特异性抗原识别而绕过表达T细胞的固有的TCR特异性。Eshhar及其同事在1993年的一项研究中首次描述了原型单链CAR,其中T细胞的特异性活化和靶向分别是通过由靶抗原特异性抗体结构域和Fc ϵ 受体或T细胞受体CD3复合物的 γ 或 ζ 信号传导亚基组成的分子介导的 (Eshhar等人,1993,Proc Natl Acad Sci U S A., 90, 720-4)。从那时起,许多研究小组设计出了具有单一肿瘤定向特异性和增强的信号传导胞内结构域的CAR分子。如今,CAR的结合结构域通常由单链抗体 (scFv) 的抗原结合结构域或选自文库并包含通过柔性接头连接的单克隆抗体 (Mab) 的轻链和重链可变片段的抗体结合片段 (Fab) 组成。scFv保留与衍生其的完整抗体相同的特异性和相似的亲和力,并且能够特异性结合至感兴趣的靶标。因此,CAR在单个融合分子中结合了抗原特异性和T细胞活化特性。实际上,scFv连接至包含CD3 ζ 的细胞内信号传导模块,以在抗原结合后诱导T细胞活化。模块结构已从仅具有CD3 ζ 信号传导结构域的第一代CAR扩展到将诸如CD28、4-1BB或OX40的信号传导胞内结构域连接至CD3 ζ 的第二代和第三代CAR,以试图模拟共刺激。通常,间隔或铰链结构域用作胞内结构域和scFv之间的接头。此类铰链结构域的掺入改善了柔性、空间组织和/或邻近度,还改善了CAR细胞的扩增 (Qin等人,Journal of Hematology & Oncology. 2017;10:68) 或肿瘤定位 (Watanabe等人,Oncoimmunology. 2016;5 (12) : e1253656)。因此,至关重要的是开发包含优化的铰链结构域的CAR。

[0004] CAR允许T细胞以MHC非依赖性机制靶向癌症。CAR的配体结合与TCR对肽/MHC (pMHC) 的结合在受体亲和力、抗原密度和空间特性上不同;并且设计针对特定靶分子的最佳CAR的实验方法依赖于体外或人肿瘤异种移植模型中转导的T细胞的功能测定。正如通过TCR/pMHC识别观察到的那样,由于CAR不太可能连续地与靶分子结合并聚集在有组织的突触中,因此可以认为,与TCR相比,CAR识别需要更高的配体密度。除了亲和力和特异性之外,这些受体的最佳构型和应用还依赖于构建体设计、信号传导结构域、载体递送系统、受体免疫细胞群和制造。

[0005] 尽管已经进行了许多尝试以实现CAR T细胞成功用于实体瘤,但结果有时令人失望。将CAR T细胞疗法应用于实体瘤遇到的三个主要障碍是 (1) 适当的肿瘤相关抗原 (TAA)

的鉴定, (2) 过继转移的细胞向肿瘤部位的有限运输, (3) 肿瘤微环境的免疫抑制作用和 (4) 不想要的或未转化的细胞的潜在安全性问题。

[0006] 关于靶标的选择, 人白细胞抗原G (HLA-G) 被描述为能够保护胎儿免受其母亲的识别和破坏的免疫系统的侵害的分子, 从而提供胎儿-母亲耐受性。除了其生理功能外, HLA-G 最近还被鉴定为免疫检查点 (ICP) 分子, 其通过与其特定受体的相互作用抑制浸润免疫细胞亚群的效应功能。HLA-G 在具有高度受限的组织表达的多种来源的多种肿瘤积液中表达。在几种恶性转化中, 肿瘤细胞的HLA-G表达急剧上升, 使其具有强烈的免疫抑制作用。临床前模型表明, HLA-G在癌细胞上的表达使其更具转移性, 并显著降低患者的生存率 (Lin A等人, *Int J Cancer*. 2012 Jul 1; 131 (1): 150-7. doi:10.1002/ijc.26375; Lin A等人, *Hum Immunol*. 2013 Apr; 74 (4): 439-46. doi:10.1016/j.humimm.2012.11.021)。

[0007] HLA-G是非经典的I类HLA分子, 其首先在绒毛膜癌细胞中被鉴定。与经典的I类HLA分子不同, HLA-G的特征在于有限的多态性, 并且其表达、结构和功能也有所不同。HLA-G的初级转录物是可变剪接的, 导致七种同种型的表达, 其中四种是膜结合的 (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3和HLA-G4), 而其他三种是可溶的 (HLA-G5, HLA-G6和HLA-G7)。HLA-G1和HLA-G5是研究最多的同种型, 并且它们呈现经典I类HLA分子的典型结构: 由非共价结合至 $\beta 2$ -微球蛋白 ($\beta 2M$) 的三个球形结构域和肽构成的重链, 而其他同种型较短, 缺乏重链的一个或两个结构域, 并且不应与 $\beta 2M$ 结合。

[0008] 考虑到开发CAR免疫疗法的基本标准是适当的TAA的鉴定、转基因效应细胞的可及性和免疫抑制性肿瘤微环境的可逆性, 并且还考虑到肿瘤细胞的HLA-G的新表达及其对肿瘤微环境的免疫抑制作用的贡献和其作为ICP和在免疫逃逸机制中的作用, 因此HLA-G是开发能够阻断该分子的新免疫疗法的杰出候选者。此外, 鉴于尚未报道针对同种异体HLA-G的刺激功能或细胞反应, 并且HLA-G表达是组织受限的, 针对HLA-G的溶细胞性CAR细胞的产生将在癌症免疫治疗领域中开辟新的可能性。

[0009] WO2016/160622公开了针对HLA-G的抗体及其在CAR细胞中的用途。然而, 由于HLA-G mRNA被剪接成不同的蛋白质同种型, 因此需要开发能够特异性识别不同HLA-G同种型 (与 $\beta 2M$ 缔合的HLA同种型和较小的无 $\beta 2M$ 的同种型) 和/或最丰富的同种型的CAR, 以消除表达免疫抑制同种型的大多数细胞, 以及开发包含优化间隔结构域和选择标记物的CAR构建体, 以改善CAR细胞扩增和选择。

发明内容

[0010] 针对最大数量的HLA-G同种型, 发明人使用新的抗HLA-G特异性单克隆抗体 (Mab) 的scFv衍生物开发了几种针对HLA-G的嵌合抗原受体。考虑到该分子表达的异质性, 这些Mab呈现出对HLA-G的高亲和力, 并且针对该分子的不同表位 [Alegre等人, *Eur. J. Immunol.* 2013. 43: 1933-1939; Alegre E等人, 2014, *Journal of Immunology Research*, 2014: 657625]。发明人还优化了抗原结合结构域和胞内结构域之间的间隔结构域, 以改善抗HLA-G CAR细胞的功效。发明人最终设计了包含可裂解的接头和允许转导的CAR细胞的选择的报告分子的CAR构建体。

[0011] 本发明提供了一种嵌合抗原受体 (CAR), 其包含抗HLA-G抗体的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内结构域, 其中所述CAR特异性结合1至6种HLA-G同种型, 优选2至5种

HLA-G同种型,优选地,这样的CAR允许区分HLA-G同种型,即,CAR不识别或结合所有7种HLA-G同种型。

[0012] 一方面,CAR特异性地结合无 β 2M的HLA-G或与 β 2M缔合的HLA-G同种型。可替代地,CAR特异性结合选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5和HLA-G6的HLA-G同种型。另一方面,CAR特异性结合HLA-G1和HLA-G5,或特异性结合HLA-G2和HLA-G6,和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型。

[0013] 本发明特别提供了一种抗HLA-G嵌合抗原受体(CAR),其从N至C端顺序地包含:(a) 肽信号序列,b) 抗HLA-G抗体或其抗原结合片段,c) 任选地间隔结构域,d) 跨膜结构域,e) 细胞内结构域,和任选地f) 可裂解的接头,以及任选地g) 截短的人CD19结构域。

[0014] 一方面,间隔结构域包含以下或由其组成:(i) 人IgG4铰链结构域,(ii) 人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域或(iii) 突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域。优选地,间隔结构域包含以下序列或由其组成:(i) SEQ ID NO:25,(ii) SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:27,或(iii) SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27,或与其显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列。

[0015] 另一方面,信号肽选自CD8a信号肽、小鼠Ig κ 信号肽、人IgG4信号肽、IL2信号肽、人IgG2信号肽和Gaussia luc信号肽。

[0016] 在一个特定方面,跨膜结构域选自CD28、CD3和CD8跨膜结构域,优选跨膜结构域是CD28跨膜结构域。

[0017] 优选地,本发明的抗HLA-G CAR包含细胞内结构域,其包含CD3 ζ 信号传导结构域和选自CD28、41BB、CD28、CD134、ICOS、OX40、CD149、DAP10、CD30、IL2-R、IL7r6、IL21-R、NKp30、NKp44、CD27、CD137和DNAM-1共刺激结构域的至少一个共刺激结构域,优选两个共刺激结构域是41BB和CD28共刺激结构域。

[0018] 一方面,可裂解的接头选自P2A、T2A、E2A、B2A和F2A。

[0019] 另一方面,截短的人CD19结构域由SEQ ID NO:29所示的序列组成。

[0020] 特别地,CAR、抗HLA-G抗体或其抗原结合片段优选地scFv选择性地结合无 β 2M的HLA-G或与 β 2M缔合的HLA-G同种型,但不是结合所有HLA-G同种型。

[0021] 另一方面,CAR、抗HLA-G抗体或其抗原结合片段优选地scFv或CAR表达细胞不结合HLA-G的 α 1结构域。

[0022] 优选地,抗HLA-G抗体或其抗原结合片段是抗HLA-G scFv,其包含:

[0023] (a) (i) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;和(ii) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;或者

[0024] (b) (i) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;和(ii) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:4显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列。

[0025] 优选地,CAR的抗原结合结构域是特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G的scFv;优选是特异性结合HLA-G1和HLA-G5的scFv,并且scFv包含:

[0026] (a) (i) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;和(ii) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:2或

与SEQ ID NO:2显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;或者

[0027] (b) (i) 包含SEQ ID NO:1的重链可变区的CDR(互补决定区)1、CDR2和CDR3;和包含SEQ ID NO:2的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3。

[0028] 可替代地,CAR的抗原结合结构域是scFv,其特异性结合无 β 2M的HLA-G,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型,并且scFv包含:

[0029] (a) (i) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3显示出大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;和(ii) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:4显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;或者

[0030] (b) (i) 包含SEQ ID NO:3的重链可变区的CDR(互补决定区)1、CDR2和CDR3;和包含SEQ ID NO:4的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3。

[0031] 优选地,CAR的细胞内结构域包含CD3 ζ 信号传导结构域和任选地选自CD28、41BB、CD28、CD134、ICOS、OX40、CD149、DAP10、CD30、IL2-R、IL7r6、IL21-R、Nkp30、Nkp44、CD27、CD137和DNAM-1共刺激结构域的至少一个共刺激结构域,优选两个共刺激结构域是41BB和CD28共刺激结构域。

[0032] 优选地,CAR的跨膜结构域选自CD28、CD3和CD8跨膜结构域,优选地跨膜结构域是CD28跨膜结构域。

[0033] 优选地,CAR进一步包含将抗原结合结构域连接至跨膜结构域的铰链区,其优选选自(i) CD28铰链,(ii) CD8 α 铰链,(iii) 人IgG4铰链结构域,(iv) 人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域,以及(v) 突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域。

[0034] 本发明还涉及多特异性CAR构建体,其包含至少两个不同的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中至少一个抗原结合结构域特异性结合与HLA-G的 β 2M结构域缔合的HLA-G同种型;并且至少另一个抗原结合结构域特异性结合不与HLA-G的 β 2M结构域缔合的HLA-G同种型。

[0035] 优选地,多特异性CAR构建体是双特异性CAR构建体,其包含(i) 包含分别包含SEQ ID NO:11、12和13的序列的CDR 1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的结构域,(ii) 包含分别包含SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的结构域,(iii) 包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7的序列的CDR 1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的结构域,以及(iv) 包含分别包含SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的结构域,任选地其中每个CDR可以任选地包含1、2、3或4个氨基酸置换、缺失或插入。

[0036] 本发明还设想了编码本发明的CAR的核酸分子、包含该核酸分子的表达载体和包含本发明的CAR或本发明的核酸分子或本发明的表达载体的细胞,优选其中所述细胞选自T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、B细胞、NK细胞、NKT细胞、单核细胞和树突状细胞,优选地,细胞是T细胞、B细胞或NK细胞。

[0037] 本发明还涉及药物组合物,其包含根据本发明的核酸分子、表达载体或细胞以及任选地药学上可接受的承载体。优选地,本发明的细胞或本发明的药物组合物用于治疗癌症或用于治疗病毒感染。用于此类用途的细胞或药物组合物可以与不靶向HLA-G的CAR疗法

组合施用。

[0038] 一方面,药物组合物包含(i)包含特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5的CAR的细胞,以及包含特异性结合无 β 2M的HLA-G优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型的CAR的细胞;或(ii)包含特异性结合HLA-G1和HLA-G5或特异性结合无 β 2M的HLA-G同种型的CAR和特异性结合HLA-G2和HLA-G6或特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型的CAR的细胞。

[0039] 最后,本发明涉及一种抗HLA-G抗体,其特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5。此类抗体包括:

[0040] (a) (i) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;和(ii)轻链可变区,其包含SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2显示大于80%,优选大于90%,还优选大于95%的同一性的同源序列;或者

[0041] (b) (i) 包含SEQ ID NO:1的重链可变区的CDR(互补决定区)1、CDR2和CDR3;和包含SEQ ID NO:2的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3。

[0042] 附图简要说明

[0043] 图1: (A) HLA-G受体 (B) HLA-G初级转录物的可变剪接产生7种HLA-G同种型,4种膜结合和3种可溶性同种型 (C) HLA-G的免疫抑制功能。

[0044] 图2:通过流式细胞术分析的单克隆抗体特异性。(A) 15E7单克隆抗体对无 β 2M的HLA-G同种型具有特异性。(B) 用15E7抗体标记的表达细胞表面HLA-G1的细胞系。(C) 用LFTT-1抗体标记的表达细胞表面HLA-G1的细胞系。

[0045] 图3: (A) 15E7第三代CAR生成结构。(B) LFTT-1第三代CAR生成结构。

[0046] 图4: (A) 3条HLA-G CAR链(取决于它们的铰链)和(B)所得HLA-G CAR蛋白的示意图。

[0047] 图5: (A) 通过流式细胞术分析Jurkat和鼠NKT 1.2细胞系上的抗HLA-G CAR 15E7和LFTT-1表达。(B) 通过免疫荧光测定HLA-G CAR 15E7和LFTT-1的细胞表面表达。

[0048] 图6: (A) 活化测定的原理。(B) 通过15E7(左图)和LFTT-1(右图)抗体的HLA-G1结合。(C) 效应HLA-G CAR细胞活化的代表性图。(D) 在表达HLA-G的靶细胞的存在下,效应HLA-G CAR细胞被强烈活化。

[0049] 图7:通过流式细胞术分析的CAR特异性。(A) Jurkat HLA-GCAR 15E7在表达HLA-G/ β 2M^{neg}的细胞的存在下被强烈活化。(B) NKT 1.2 HLA-G CAR LFTT-1在Jeg-3细胞系的存在下被强烈活化。

[0050] 图8:通过(A)研究肿瘤细胞裂解和(B)在效应CAR细胞上的CD107a表达,研究了HLA-G CAR T细胞对K562、K562-HLA-G1和JEG-3肿瘤细胞的细胞溶解功能。

[0051] 图9:在与K562、K562-HLA-G1和JEG-3肿瘤细胞共孵育后,研究了HLA-G CAR细胞的IFN- γ 分泌。

[0052] 图10:HLA-G CAR-T细胞的体内抗肿瘤功能(A)具有HLA-GCAR-T细胞的小鼠中的体内实验方案(B)NGS小鼠中针对HLA-G肿瘤细胞的体内CAR-T细胞毒性。

[0053] 发明详述

[0054] 引言

[0055] 本发明涉及包含细胞外结构域的嵌合抗原受体(CAR),其主要由以下构成:抗HLA-

G特异性抗体的抗原结合结构域、任选地铰链结构域(其包含(i)人IgG4铰链结构域、(ii)人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域或(iii)突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域或由其组成)、跨膜结构域、取决于CAR设计的产生包含一个、两个或三个共刺激结构的细胞内结构域、任选地可裂解的接头和任选地报告分子。

[0056] 特别地,根据本发明的CAR特异性结合1至6种,优选2至5种HLA-G同种型,更优选选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5和HLA-G6。

[0057] 本发明还涉及特异性结合HLA-G1和HLA-G5或特异性结合HLA-G2和HLA-G6同种型的CAR。

[0058] 还提供了多特异性CAR构建体,优选地双特异性CAR构建体,其包含识别无 β 2M的HLA-G同种型优选HLA-G2和HLA-G6和/或HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型的一个结构域;和识别与 β 2M缔合的HLA-G同种型,优选HLA-G1和HLA-G5同种型的一个结构域。

[0059] 一方面,本发明进一步涉及特异性结合无 β 2M(β -2-微球蛋白)的HLA-G同种型的CAR。另一方面,本发明进一步涉及特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型的CAR。

[0060] 特别涉及特异性结合HLA-G1和HLA-G5或HLA-G2和HLA-G6同种型的单克隆抗体或单链可变片段(scFv)分子。还涉及特异性结合无 β 2M的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型的单克隆抗体或单链可变片段(scFv)分子。还涉及特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型,优选HLA-G1和HLA-G5同种型的单克隆抗体或单链可变片段(scFv)分子。

[0061] 本发明还涉及核酸构建体或包含该核酸构建体的载体,其可以被转导至细胞,优选地免疫细胞,例如T细胞,从而产生经工程改造以表达编码的CAR的重组免疫细胞。还提供了被转导以表达本发明的CAR的细胞、细胞群以及包含CAR表达细胞的药物组合物。

[0062] 本发明可以特别地涉及表达两种不同CAR的免疫细胞,特别是特异性结合无 β 2M的HLA-G同种型的CAR,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型的CAR;和特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型,优选HLA-G1和HLA-G5同种型的CAR。

[0063] 组合物包括用于施用例如用于过继细胞疗法的药物组合物和制剂。还提供了用于制备CAR表达细胞并将细胞和组合物施用至受试者(例如患者)的方法。

[0064] 缩略语

[0065]	APC: 抗原呈递细胞 β2M: β-2-微球蛋白 CAR: 嵌合抗原受体 CTL: 细胞毒性 T 淋巴细胞 DC: 树突状细胞 HLA-G: 人白细胞抗原 G ICP: 免疫检查点 ITAM: 免疫受体酪氨酸活化基序 Mab(s): 单克隆抗体	MFI: 平均荧光强度 MOI: 感染复数 NK: 自然杀伤 MHC: 主要组织相容性复合体 PBS: 磷酸缓冲盐水 PBMC: 外周血单核细胞 scFv: 单链可变片段 SD: 标准偏差 TAA: 肿瘤相关抗原 WT: 野生型
--------	--	---

[0066] 定义

[0067] 为了促进对本发明的理解,下面定义了许多术语。

[0068] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”(CAR)、“工程改造的细胞受体”、“嵌合细胞受体”或“嵌合免疫受体”(ICR)是指将抗原结合特异性嫁接到免疫细胞(例如T细胞或NK细胞)上的工程改造的受体,由此将抗原结合结构域的抗原结合特性与免疫细胞的免疫原性活性(例如T细胞的裂解能力和自我更新)结合在一起。特别地,CAR是指包含能够结合抗原的细胞外结构域、跨膜结构域、任选地铰链结构域和至少一个细胞内结构域的融合蛋白。术语“能够结合抗原的细胞外结构域”、“外部结构域”、“胞外结构域”和“抗原结合结构域”在本文中可互换使用,是指可以结合靶抗原(例如HLA-G同种型)的任何寡肽或多肽。特别地,本文所用的术语“抗原结合结构域”或“抗原特异性靶向结构域”是指靶向并结合特定抗原(例如HLA-G抗原)的CAR的区域。当CAR在宿主细胞中表达时,该结构域形成受体的细胞外结构域(胞外结构域)。CAR的抗原结合结构域通常来源于抗体,并且可以由单链抗体(scFv)或抗原结合片段(Fab)的抗原结合结构域组成。术语“细胞内结构域”、“内部结构域”、“胞质结构域”和“细胞内信号传导结构域”在本文中可互换使用,是指任何已知用作传递引起细胞中生物过程的活化或抑制的信号的结构域的寡肽或多肽。细胞内信号传导结构域可产生信号,该信号促进用包含CAR的核酸序列转导的细胞的免疫效应功能,例如细胞溶解活性和辅助活性,包括细胞因子的分泌。术语“跨膜结构域”是指任何已知跨细胞膜并可起到连接细胞外结构域和信号传导结构域的作用的寡肽或多肽。这可以是单个 α 螺旋、跨膜 β 桶、短杆菌肽A的 β 螺旋或任何其他结构。通常,跨膜结构域表示跨膜蛋白(也称为整合蛋白)的单个跨膜 α 螺旋。

[0069] 嵌合抗原受体可以任选地包含“铰链结构域”,其充当细胞外结构域和跨膜结构域之间的接头。如本文所用,术语“铰链”、“间隔子”或“接头”是指通常在多肽构建体的两个或更多个结构域之间编码的可变长度的氨基酸序列,以赋予例如柔性、改善的空间组织和/或邻近度。如本文所用,术语“可裂解的接头”是指可变长度的肽链,其可以被蛋白酶或酶通过蛋白水解方式裂解或消化,或者可以自身裂解。肽接头裂解后,其完整性通常受到损害,并

导致位于可裂解的接头任一侧(C末端和N末端)的结构域的分離。“可裂解的接头”通常包含裂解位点。如本文所用,术语“裂解位点”是指可以被裂解剂(例如蛋白酶)特异性裂解或自身裂解的氨基酸的特定序列。在scFv的上下文中使用的术语“接头”是指单独或组合使用以将可变重链区和可变轻链区连接在一起的由氨基酸(例如甘氨酸和/或丝氨酸残基)组成的肽接头。

[0070] 嵌合抗原受体可以任选地包含信号肽。术语“信号肽”、“靶向信号”、“定位信号”、“转运肽”或“前导序列”是指存在于大多数新合成的旨在朝向分泌途径的蛋白质的N末端的短肽。信号肽的核心可能包含一长段疏水性氨基酸。信号肽可以从或不从成熟多肽上裂解下来。

[0071] 如本文所用,术语“抗体”是指单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体,人抗体,人源化抗体,骆驼抗体,嵌合抗体,抗原结合片段,例如单链可变片段(scFv),单链抗体,单结构域抗体,抗原结合片段(Fab),F(ab')片段,二硫键连接的可变片段(sdFv),胞内抗体,纳米抗体和上述任何一种的表位结合片段。特别地,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即包含抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如IgG,IgE,IgM,IgD,IgA和IgY)、类别(例如IgG₁,IgG₂,IgG₃,IgG₄,IgA₁和IgA₂)或亚类。除非另有特别说明,否则术语“抗体”包括在基本上排除与其他分子的结合的情况下特异性结合感兴趣的分子(或一组相似的感兴趣的分子,例如HLA-G同种型)的完整的免疫球蛋白和“抗体片段”或“抗原结合片段”。术语“抗体”还包括基因工程改造的形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体),异源缀合物抗体(例如双特异性抗体)。优选地,术语抗体是指单克隆抗体,甚至更优选地是指衍生自单克隆抗体的scFv。

[0072] 就结构而言,抗体可具有通过二硫键相互连接的重(H)链和轻(L)链。轻链有两种类型,即lambda(λ)和kappa(κ)。每条重链和轻链均包含恒定区和可变区(或“结构域”)。轻链和重链可变区包含被三个高变区(也称为“互补决定区”或“CDR”)打断的“框架”区。已经定义了框架区和CDR的范围(参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991,其通过引用并入本文)。框架区起到形成支架的作用,该支架通过链间非共价相互作用将CDR定位在正确的方向上。CDR主要负责与抗原表位的结合。每条链的CDR通常称为CDR1、CDR2和CDR3,其从N末端开始依次编号。根据本发明的抗体的VL和VH结构域可以包含四个框架区或“FR”,其在本领域中并且在本文中分别被称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;和“框架区4”或“FR4”。这些框架区被三个互补决定区或“CDR”打断,其在本领域中分别被称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;和“互补决定区3”或“CDR3”。这些框架区和互补决定区优选按以下顺序可操作地连接:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4(从氨基末端到羧基末端)。

[0073] 如本文所用,“抗体重链”是指存在于抗体构象中的两种类型的多肽链中的较大者。

[0074] 如本文所用,“抗体轻链”是指存在于抗体构象中的两种类型的多肽链中的较小者,κ和λ轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0075] 术语“scFv”是指包含至少一个包含轻链可变区的抗体片段和至少一个包含重链可变区的抗体片段的蛋白质,其中所述轻链可变区和重链可变区是连续连接的(例如,经由

合成接头,例如短的柔性多肽接头),并且能够被表达为单链多肽,并且其中scFv保留了其衍生自的完整抗体的特异性。除非另有说明,否则如本文所用,scFv可具有任意顺序的VL和VH可变区,例如相对于多肽的N-末端和C-末端,scFv可包含VL-接头-VH或可包含VH-接头-VL。接头可包含框架序列的部分。

[0076] 如本文所用,术语“衍生自”和“来源于”是指具有衍生自亲本化合物或蛋白质的结构的化合物,并且其结构与本文公开的那些足够相似并且基于该相似性而由本领域技术人员预期表现出与要求保护的化合物相同或相似的性质、活性和用途。例如,衍生自单克隆抗体的scFv是指与所述单克隆抗体具有相同特性的抗体片段,例如具有相同或相似的VH和VL和/或识别相同的表位。

[0077] 如本文所用,术语“抗原”是指可以被特定体液或细胞免疫产物例如抗体分子、T细胞受体或CAR特异性结合的化合物、组合物或物质。很明显的是,本发明包括完整的抗原及其抗原片段。很明显的是,抗原可以合成产生或可以来源于生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。优选地,术语“抗原”在本文中指HLA-G,特别是指HLA-G的同种型。

[0078] 如本文所用,术语“HLA-G”和“人白细胞抗原G”是指与此名称相关的特定分子以及具有类似生物学功能的任何其他分子,其与HLA-G(包括但不限于其几种同种型中的任何一种,包括但不限于膜结合同种型(例如HLA-G1,HLA-G2,HLA-G3,HLA-G4),可溶性同种型(例如HLA-G5,HLA-G6,HLA-G7)和通过膜结合同种型的蛋白水解裂解而生成的可溶性形式(例如sHLA-G1))具有至少80%的氨基酸序列同一性,优选90%的序列同一性,更优选至少95%的序列同一性。HLA-G序列的实例在下文提供。

[0079] 如本文所用,“结合”或“绑定”是指识别并接触抗原的肽、多肽、蛋白质、融合蛋白和抗体(包括抗体片段)。优选地,它是指抗原-抗体类型的相互作用。“特异性结合”或“免疫特异性结合”是指抗体识别特定抗原,但基本上不识别或结合样品中的其他分子。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性绑定”可用于指抗体、蛋白质或肽与第二化学物种的相互作用,以表示相互作用取决于特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在。如本文所用,术语“特异性结合”是指具有至少 10^{-6} M的结合亲和力的抗体与抗原之间的接触。在某些方面,抗体以至少约 10^{-7} M,并且优选地 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M的亲和力结合。

[0080] 如本文所用,术语“特异性结合HLA-G同种型的抗体”或“特异性结合HLA-G同种型的CAR”和类似术语是指特异性识别一种或几种HLA-G同种型并且不识别或弱识别其他抗原(包括其他HLA-G同种型)的抗体或抗体片段。优选地,当与对其他抗原或其片段(包括其他HLA-G同种型)的亲和力相比时,特异性结合一种或几种HLA-G同种型的抗体或抗体片段对该或这些HLA-G同种型或其片段具有更高的亲和力。

[0081] 抗体的亲和力可以是其在单个抗原-抗体位点上与特定抗原的结合的度量,并且实质上是抗体的抗原结合位点与特定表位之间的相互作用中存在的所有吸引力和排斥力的总和。抗体对特定抗原(例如HLA-G同种型)的亲和力可以通过解离平衡常数K表示,该常数由方程 $K_d = [Ag][Ab]/[Ag\ Ab]$ 定义,其代表抗体结合位点的亲和力;其中[Ag]是游离抗原的浓度(M),[Ab]是游离抗体的浓度(M),以及[Ag Ab]是抗原-抗体复合物的浓度(M)。当抗原和抗体在一起强烈反应时,几乎没有游离抗原或游离抗体,因此抗体的平衡常数或亲和力将很低。抗体的平均亲和力至少为 10^{-6} M。在某些方面,CAR的抗原结合结构域以至少约

10^{-6}M ,并且优选地至少约 10^{-7}M , 10^{-8}M , 10^{-9}M 或 10^{-10}M 的亲合力结合1至6种,优选2至5种HLA-G同种型。结合亲合力可以通过本领域技术人员可用的任何方法特别是通过表面等离子体共振 (SPR) 来测量。

[0082] 如本文所用,“刺激性配体”是指当存在于抗原呈递细胞(例如,APC,树突状细胞,B细胞等)上时可以与T细胞上的同源结合伴侣(在本文中称为“刺激分子”)特异性结合的配体,从而介导T细胞的初次反应,包括但不限于活化、免疫反应的起始、增殖等。

[0083] 如本文所用,术语“共刺激配体”包括抗原呈递细胞(例如,APC,树突状细胞,B细胞等)上的特异性结合T细胞上的同源结合伴侣(在本文中称为“刺激分子”)的分子,从而提供信号,除了由例如TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子的结合提供的主要信号外,该信号介导T细胞反应,包括但不限于增殖、活化、分化等。

[0084] 如本文所用,“共刺激分子”是指由免疫细胞(例如,T细胞,NK细胞,B细胞)表达的分子,其提供一种或多种对于免疫细胞信号传导途径的至少一些方面以刺激方式调节免疫细胞的活化的胞质信号传导序列。一方面,信号是主要信号,其例如通过TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子的结合而起始并导致T细胞反应(包括但不限于,增殖,活化,分化等)的介导。以刺激方式起作用的主要胞质信号传导序列(也称为“主要信号传导结构域”)可以包含被称为免疫受体酪氨酸活化基序或ITAM的信号传导基序。特别地,该术语是指与抗原呈递细胞上存在的共刺激配体特异性结合的T细胞上的同源结合伴侣,从而介导T细胞的共刺激反应,例如但不限于增殖活化、分化等。

[0085] 如本文所用,“刺激分子”是指与存在于抗原呈递细胞上的同源刺激性配体特异性结合的T细胞上的分子。

[0086] 如本文所用,“共刺激信号”是指这样的信号,其与主要信号(例如TCR/CD3连接)组合地导致T细胞增殖活化、分化等,和/或关键分子的上调或下调。

[0087] 术语“刺激”或“刺激性”是指通过刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其同源配体的结合诱导从而介导信号转导事件例如但不限于经由TCR/CD3复合物的信号转导的主要反应。刺激可以介导某些分子的改变的表达,例如TGF- β 的下调和/或细胞骨架结构的重组等。

[0088] 如本文所用,“报告分子”或“选择标记物”是指允许从试图被转染的细胞,特别是被CAR构建体转染的细胞的群体中检测和/或选择表达细胞的多核苷酸或多肽。当与特定的构建体连接时,它允许建立这种构建体在细胞中的存在和/或定量。

[0089] 如本文所用,“免疫细胞”是指参与先天性和适应性免疫的细胞,例如白血球(白细胞),其来源于骨髓中产生的造血干细胞(HSC),淋巴细胞(T细胞,B细胞,自然杀伤(NK)细胞和自然杀伤T细胞(NKT))和骨髓来源的细胞(嗜中性粒细胞,嗜酸性粒细胞,嗜碱性粒细胞,单核细胞,巨噬细胞,树突状细胞)。特别地,免疫细胞可以选自包含B细胞、T细胞特别是CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞、NK细胞、NKT细胞、APC细胞、树突状细胞和单核细胞的非穷举性列表。

[0090] 根据本发明,免疫细胞(优选T细胞)的供体和受体可以是单个个体或不同个体,例如自体、同种异体或异种的个体。如本文所用,术语“自体”是指获自个体并随后移植回同一个体的细胞或组织。如本文所用,术语“同种异体”是指从相同物种的不同个体获得的细胞或组织,其中供体和受体在遗传上不相同。关于本公开内容,同种异体细胞移植或组织移植涉及供体和受体是同一物种的不同个体的细胞或组织的移植。术语“异种”是指从不同物种的生物体衍生或获得。关于本公开内容,异种细胞移植或组织移植涉及其中供体和受体是

不同物种的不同个体的细胞或组织的移植。

[0091] 术语“治疗”是指旨在改善患者健康状况的任何行为,例如治疗、阻止、预防和延迟疾病或疾病症状。它表示疾病的治愈性治疗和/或预防性治疗。治愈性治疗定义为导致治愈的治疗或减轻、改善和/或消除、减轻和/或稳定疾病或疾病症状或其直接或间接引起的痛苦的治疗。预防性治疗包括导致疾病的预防的治疗和减少和/或延迟疾病的进展和/或发病率或其发生的风险的治疗。在某些实施方案中,这样的术语是指疾病、病症、感染或与其相关的症状的改善或根除。在其他实施方案中,该术语是指使癌症的扩散或恶化最小化。根据本发明的治疗不一定意味着100%或完全治疗。而是,存在不同程度的治疗,其中本领域普通技术人员认为其具有潜在的益处或治疗效果。

[0092] 如本文所用,术语“病症”或“疾病”是指由于遗传或发育错误、感染、毒药、营养缺乏或不平衡、毒性或不利的因素引起身体的器官、部分、结构或系统的不正确运作。优选地,这些术语是指健康病症或疾病,例如破坏正常身体或精神功能的疾病。更优选地,术语病症是指影响动物和/或人的免疫和/或炎症性疾病,例如癌症。

[0093] 如本文所用,术语“免疫疾病”是指受试者中特征在于由受试者对其自身的细胞、组织和/或器官的免疫反应引起的细胞、组织和/或器官损伤的病况。术语“炎症性疾病”是指受试者中特征在于炎症例如慢性炎症的病况。自身免疫性病症可能与或可能不与炎症相关。此外,炎症可能由或可能不由自身免疫性病症引起。

[0094] 本文所用的术语“癌症”定义为特征在于异常细胞的快速且不受控制的生长的疾病。癌细胞可以局部地或通过血液和淋巴系统扩散到身体的其他部位。

[0095] 如本文所用,术语“过继细胞疗法”或“过继T细胞疗法”或“ACT”是指将细胞转移至患者体内,其中在转移至受试者中之前,细胞已被工程改造或以其他方式改变。ACT的一个实例是从受试者的血液或肿瘤中收获免疫细胞,例如T细胞。然后将这些免疫细胞离体刺激、培养并扩增。然后用允许细胞表达新分子(例如CAR)的一种或多种核酸构建体转导细胞,从而为工程改造的免疫细胞提供抵抗疾病(例如癌症)的新机制。在一些情况下,CAR包含特异性识别由肿瘤或癌症表达的抗原(例如HLA-G)的抗原结合结构域。ACT程序中使用的典型免疫细胞包括肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或T细胞。ACT中使用的免疫细胞可以来源于患者/受试者本身,或来源于通用供体。ACT也可以伴随着可以与输送回受试者中的重组细胞竞争的受试者自身的淋巴细胞的淋巴细胞删除的可选步骤。

[0096] 术语“CAR疗法”或“CAR细胞疗法”在本文中可互换使用,并且是指其中免疫细胞被修饰以表达CAR以预防或治疗疾病(例如病毒感染或癌症)的治疗类型。这样的免疫细胞可以是自体的或同种异体的。免疫细胞可以是例如B淋巴细胞,T淋巴细胞,自然杀伤细胞或自然杀伤T细胞等。例如,通过从患者获得免疫细胞、用允许CAR表达的CAR基因转染免疫细胞(这样的CAR针对患者疾病中涉及的抗原)、扩增修饰的免疫细胞群体和将细胞重新输送回患者中来提供CAR细胞疗法。如本文所用,术语“抗肿瘤作用”是指可以通过减少肿瘤体积、减少肿瘤细胞数量、减少转移瘤数量、增加预期寿命或改善与癌症病况相关的各种生理症状来体现的生物学作用。“抗肿瘤作用”还可以通过本发明的细胞和CAR在预防肿瘤的最初发生或限制转移形成中的能力来体现。

[0097] 如本文所用,术语“溶细胞的”或“细胞毒性的”是指由细胞毒性细胞(例如T细胞或NK细胞和NKT细胞)介导的免疫反应的结果,其导致靶细胞的死亡(例如通过凋亡)。

[0098] 如本文所用,术语“受试者”、“宿主”、“个体”或“患者”是指人和兽医受试者,特别是动物,优选哺乳动物,甚至更优选人,包括成人和儿童。然而,术语“受试者”还涵盖非人动物,尤其是哺乳动物,例如狗、猫、马、牛、猪、羊和非人灵长类动物。

[0099] 如本文所用,短语“副作用”涵盖预防剂或治疗剂的不期望的和不利的作用。副作用始终是不想要的,但不想要的作用并不一定是不利的。来自治疗(例如预防剂或治疗剂)的不利作用可能是有害的、不舒服的或有风险的。患者通常经历的不期望的作用是众多的并且在本领域中是已知的。

[0100] 如本文所用,术语“组合”是指使用多于一种疗法(例如,预防剂和/或治疗剂)。术语“组合”的使用不限制将疗法(例如,预防剂和/或治疗剂)施用至患有疾病或病症的受试者的顺序。

[0101] 如本文所用,术语“调节”是指与在不存在治疗或化合物的情况下受试者中的反应水平相比,和/或与在其他方面相同但未经治疗的受试者中的反应水平相比,介导受试者中的反应水平的可检测的增加或降低。该术语涵盖扰动和/或影响天然信号或反应,从而在受试者(优选人)中介导有益的治疗反应。

[0102] 如本文所用,“药物或兽医组合物”是指一种或多种活性剂(例如包含根据本发明的抗HLA-G抗体的抗原结合结构域)与任选的其他化学成分(例如生理上合适的承载体和赋形剂)的制剂。药物或兽医组合物的目的是促进活性剂向生物体的施用。本发明的组合物可以是适合于任何常规施用或使用途径的形式。在一个实施方案中,“组合物”通常是指活性剂(例如化合物或组合物)与天然存在或非天然存在的载体(惰性(例如可检测的试剂或标记)或活性的,例如佐剂,稀释剂,粘合剂,稳定剂,缓冲剂,盐,亲脂性溶剂,防腐剂,佐剂等,并且包括药学上可接受的载体)的组合。

[0103] 如本文所述的“可接受的媒介物”或“可接受的载体”是本领域技术人员已知可用于配制药物或兽医组合物的任何已知化合物或化合物的组合。

[0104] “治疗有效量”是这样的量,其是当施用至受试者时治疗目标疾病或病症或产生所需效果所需的活性剂的量。“有效量”将根据一种或多种药剂、疾病及其严重程度以及要治疗的受试者的年龄、体重和特征而变化。

[0105] 如本文所用,术语“药物”是指具有针对病症或疾病的治疗或预防性质的任何物质或组合物。

[0106] 术语“转染”或“转化”或“转导”在本文可互换使用,并用于嵌合抗原受体细胞的产生,并且特别是指将外来的或外源的核苷酸序列引入细胞的过程。外源核酸可以稳定地或瞬时地引入宿主细胞中。“转染”或“转化”或“转导”的细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。在一些实施方案中,该转导通过载体,优选慢病毒载体进行。

[0107] 如本文所用,术语“核酸构建体”和“载体”是等同的,并且是指用于将过客核酸序列(例如DNA或RNA)转移到宿主细胞中的核酸分子。载体可包含复制起点、可选择的标记物和任选地用于插入序列或基因的合适位点。载体可以是自我复制的染色体外载体,或整合入宿主基因组的载体。它也可以包含表达元件包括例如启动子、正确的翻译起始序列例如核糖体结合位点和起始密码子、终止密码子和转录终止序列。核酸构建体还可包含其他调节区,例如增强子、沉默子和边界元件/绝缘子,以指导给定基因的转录水平。能够指导与其可操作地连接的基因和/或核酸序列的表达的载体在本文中也可以被称为“表达载体”。有

几种常见类型的载体,包括核酸构建体、噬菌粒、病毒基因组、黏粒和人工染色体。核酸构建体可以是用于稳定或瞬时表达基因或序列的载体。核酸构建体可以包括复制起始(ori)核酸构建体。特别地,核酸构建体可以被设计用于在不同宿主之间的遗传转移,包括但不限于质粒、病毒、黏粒、噬菌体、BAC、YAC。这样的载体可以根据本领域已知的技术由可商购获得的载体制备或例如由杆状病毒、逆转录病毒、腺病毒或AAV产生。优选地,这些术语是指慢病毒载体。

[0108] 如本文所用,术语“表达”是指多核苷酸被转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。基因的表达水平可以通过测量细胞或组织样品中的mRNA或蛋白质的量来确定。一方面,可以将来自一个样品的基因的表达水平与来自对照或参考样品的该基因的表达水平直接比较。另一方面,可以将来自一个样品的基因的表达水平与在施用化合物之后来自相同样品的该基因的表达水平直接比较。

[0109] 术语“功能变体”或“生物等同物”如本文所用可互换使用,并且是指与亲本多肽具有实质或显著的序列同一性或相似性的多肽(CAR或蛋白质),该功能变体保留该变体所来自的多肽的生物学活性。除非本文具体叙述,否则预期本文提及的任何多核苷酸、多肽或蛋白质也包括其等同物。例如,等同物意指至少约70%的同源性或同一性,或至少80%的同源性或同一性,和可替代地,或至少约85%,或可替代地至少约90%,或可替代地至少约95%,或可替代地98%的同源性或同一性,并且表现出与参考蛋白、多肽或核酸基本等同的生物学活性。可替代地,当提及多核苷酸时,其等同物是在严格条件下与参考多核苷酸或其互补序列杂交的多核苷酸。当与抗体相关时,术语“等同”或“生物学等同”是指通过ELISA或其他合适的方法测量的抗体特异性结合其表位蛋白或其片段的能力是相似或保守的。生物等同抗体包括但不限于与参考抗体结合相同表位的那些抗体、肽、抗体片段、抗体变体、抗体衍生物和抗体模拟物。当与CAR相关时,功能变体包括例如本文所述的CAR(亲本CAR)的那些变体,其保留以与亲本CAR相似程度、相同程度或更高程度识别靶细胞的能力。关于亲本CAR,功能变体可以例如与亲本CAR具有至少约50%,75%,80%,90%,98%或更高的氨基酸序列同一性。

[0110] “变体”或“等同物”也指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本多肽序列的多肽序列。例如,在本发明的上下文中,变体可以是单克隆抗体或其片段的变体或CAR的变体。通常,变体包含1至50个氨基酸修饰,优选1至40个氨基酸修饰。特别地,变体与其亲本相比可以具有1至30个氨基酸变化,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸变化。变体可包含一个或几个氨基酸置换,和/或一个或几个氨基酸插入,和/或一个或几个氨基酸缺失。在一些实施方案中,变体可以包含一个或几个保守置换,例如,如上文所示的。在一些其他实施方案中,抗体或其抗原结合片段特别是scFv的变体可以在亲本Mab的CDR结构域中包含一个或几个氨基酸修饰。在一些其他实施方案中,亲本Mab的变体可以在至少一个框架结构域中包含一个或几个氨基酸修饰。

[0111] 如本文所用,“亲本多肽”或“多肽亲本”是指未经修饰的多肽,其随后被修饰以产生变体。在本发明的上下文中,亲本多肽可以是抗体,优选单克隆抗体,甚至更优选scFv。

[0112] 如本文所用,当在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中使用时,“同源性”、“同一性”或“相似性”是指相同或具有指定百分比的相同的核苷酸或氨基酸残基(例如在指

定区域(例如,编码本文所述抗体的核苷酸序列或本文所述抗体的氨基酸序列)上具有至少60%的同一性,优选至少65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更高的同一性)的两个或更多个序列或子序列。同源性可以通过比较每个序列(其可以为了比较的目的而被对齐)中的位置来确定。当比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度是序列共有的匹配或同源位置数量的函数。关于序列的术语“同一性百分比”表示所述序列之间的同一性或同源性水平,并且可以通过本领域本身已知的技术来确定。通常,两个核酸序列之间的同一性百分比是通过计算机程序确定的,例如在GCG程序包中提供的GAP (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, 1996年8月, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. 和 Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453)。通过将设置调整为例如DNA序列(特别地:5.0的GAP创建罚分和0.3的GAP延伸罚分),可以使用可作为GCG程序包的一部分的Pileup比对软件将核酸分子彼此对齐。两个序列之间的同一性百分比的确定还可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的一个非限制性实例是在Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人, eds. 1987) 增补30, 7.7.18节, 表7.7.1. 中描述的那些或Karlin和Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268的并在Karlin和Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877中修订的算法。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如,得分=100, 字长=12, 以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以使用XBLAST程序参数集进行BLAST蛋白质搜索,例如得分=50, 字长=3, 以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等人, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402中所述使用空位BLAST。可替代地,可以使用PSI-BLAST执行迭代搜索,其检测分子之间的远距离关系(Id)。当使用BLAST、空位BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST的程序)的默认参数(参见,例如NCBI网站)。用于序列比较的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers和Miller, 1988, CABIOS 4:11-17的算法。此类算法被合并到ALIGN程序(2.0版)中,该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM 120重量残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。例如,可以使用本领域已知的软件程序来确定比对和同源性或序列同一性百分比。优选地,默认参数用于比对。优选的比对程序是使用默认参数的BLAST。特别地,优选程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;过滤器=无;链=两者;截断值=60;期望=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序方式=高得分;数据库=非冗余, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详细信息可以在以下Internet地址找到:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。为了比较两个氨基酸序列,可以使用例如由EMBL-EBI提供的用于蛋白质的成对序列比对的“Emboss needle”工具,并可获自:www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_needle&context=protein,使用默认设置:(I) 矩阵:BLOSUM62, (ii) 空位打开:10, (iii) 空位延伸:0.5, (iv) 输出格式:成对, (v) 末端空位罚分:假, (vi) 末端空位打开:10, (vii) 末端空位延伸:0.5。

[0113] 核苷酸或氨基酸序列之间的序列同一性可以通过比较序列的比对来确定。当比较序列中的相同位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则在该位置的分子相同。将比对评分为

同一性百分比是所比较的序列共有的位置上相同氨基酸或碱基数量的函数。当比较序列时,最佳比对可能需要将空位引入一个或多个序列中,以考虑序列中可能的插入和缺失。序列比较方法可以采用空位罚分,使得对于所比较的序列中相同数量的相同分子,具有尽可能少的空位的序列比对,反映两个比较的序列之间的更高的相关性,将获得比具有许多空位的序列比对更高的得分。最大同一性百分比的计算涉及考虑空位罚分的最佳比对的产生。

[0114] 该术语还包括具有缺失和/或添加的序列,以及具有置换,特别是保守置换的序列。优选地,同一性存在于长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域上,或更优选地存在于长度为至少50-100个氨基酸或核苷酸的区域上。“无关的”或“非同源的”序列与本文公开的序列之一具有小于50%的同一性,或可替代地小于40%的同一性,优选小于30%。

[0115] HLA-G抗原

[0116] “HLA-G”表示包括至少七种同种型的人白细胞抗原G。它的表达主要限于绒毛外滋养层细胞的胎儿-母体界面;胎盘,羊膜;一些健康的成人组织,例如胸腺、角膜、支气管上皮细胞和胰腺;以及不同类型的细胞,例如间充质干细胞,一些活化的单核细胞以及红系和内皮前体。可溶性HLA-G也发现于体液中,例如血浆、脑脊液、恶性腹水、胸腔积液和精子。尽管HLA-G基因在一些组织中没有活性,但其表达可以由某些分子(例如孕酮或抗癌药)诱导。此外,该分子还可以在病理状况例如癌症、多发性硬化、炎症疾病和病毒感染中或在同种异体移植后新表达。可以在个体的血清/血浆中检测到可溶性HLA-G(sHLA-G)。

[0117] HLA-G与经典的I类HLA分子的不同之处在于其低遗传多样性、组织受限的表达、七种同种型的存在以及免疫抑制功能。该分子通过直接结合三种抑制性受体(白细胞免疫球蛋白样受体B1 (LILRB1/ILT2/CD85j), LILRB2 (ILT4/CD85d) 和KIR2DL4 (或CD158d)) 发挥免疫抑制功能,如图1A所示。对于LILRB受体,识别位点通过HLA-G的 $\alpha 3$ 结构域发生,并且其不太可能受肽影响。LILRB1由B细胞、一些T细胞、一些NK细胞以及所有单核细胞/树突状细胞表达,而LILRB2是髓样特异性的,并且其表达限于单核细胞/树突状细胞。KIR2DL4是HLA-G的特异性受体,仅由NK细胞的CD56bright亚群表达。已显示LILRB1和LILRB2通过 $\alpha 3$ 结构域和B2M结合多种经典的HLA分子,其中HLA-G是最高亲和力的配体,而对于KIR2DL4,HLA-G是唯一已知的配体。此外,已经证明LILRB1和LILRB2对HLA-G多聚体的亲和力高于单体结构。重要的是弄清LILRB1和LILRB2与其配体结合的方式之间的差异:LILRB1对与 $\beta 2M$ 缔合的HLA-G重链显示出更高的亲和力,而LILRB2通过结合 $\alpha 3$ 结构域而不是 $\beta 2M$ 显示出明显不同的MHC I结合识别,其涉及芳香族氨基酸Phe-195和Tyr-197。这解释了后一受体的 $\beta 2M$ 非依赖性HLA-G结合及其对无 $\beta 2M$ 同种型的更高亲和力。

[0118] 通过连接这些受体,HLA-G充当免疫系统的下调调节剂,针对其已描述了一些功能:抑制子宫和外周血NK细胞的溶细胞功能,细胞毒性T淋巴细胞的抗原特异性溶细胞功能,CD4⁺T细胞的异常增殖(alloproliferative)反应,T细胞和外周血NK细胞的增殖以及树突状细胞的成熟和功能,如图1C所示。此外,HLA-G可诱导抑制性细胞的产生。但是,与经典的I类HLA分子不同,迄今为止尚未报道HLA-G的刺激功能,也没有报道针对同种异体HLA-G的反应。

[0119] HLA-G可抑制所有免疫细胞亚群;因此,它可以阻断抗肿瘤反应的所有阶段。该分子在许多类型的原发性肿瘤、转移瘤和恶性积液中表达,并且其还可以在肿瘤细胞和肿瘤

浸润细胞上被发现。已显示,肿瘤细胞系的HLA-G表达保护它们免受细胞毒性T淋巴细胞和NK细胞的破坏。因此,恶性细胞的HLA-G表达可通过抑制肿瘤浸润性NK、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和抗原呈递细胞(APC)的活性来阻止肿瘤免疫消除。

[0120] HLA-G表达在转录水平上主要受独特的基因启动子控制,并且在转录后的水平上受可变剪接、mRNA稳定性、翻译和向细胞表面的蛋白质转运的控制。

[0121] HLA-G的主要转录物是可变剪接的,导致表达7种同种型,其中4种是膜结合的(HLA-G1,HLA-G2,HLA-G3和HLA-G4),以及3种是可溶的(HLA-G5,HLA-G6和HLA-G7)。HLA-G1和HLA-G5呈现经典I类HLA分子的典型结构:由非共价结合至 β 2-微球蛋白(β 2M)的三个球形结构域和肽构成的重链,而其他同种型较短,缺乏重链的一个或两个结构域,并且不应与 β 2M结合(图1A)。

[0122] HLA-G1和HLA-G5被认为是最丰富的同种型,可能是因为缺乏针对其他同种型的抗体多样性,特别是缺乏针对无 β 2M的同种型的抗体。

[0123] HLA-G1同种型是具有与 β 2-微球蛋白缔合的 α 1、 α 2和 α 3结构域的完整同种型。HLA-G2同种型没有 α 2结构域,而HLA-G3没有 α 2和 α 3结构域,以及HLA-G4没有 α 3结构域。同种型HLA-G2、HLA-G3和HLA-G4均不结合 β 2M。可溶性HLA-G5和HLA-G6同种型分别包含与HLA-G1和HLA-G2相同的额外球状结构域。HLA-G7同种型仅具有一个与内含子2编码的两个氨基酸相连的 α 1结构域。HLA-G5同种型与 β 2M结合,而同种型HLA-G6和HLA-G7不与 β 2M结合。

[0124] 此外,HLA-G分子可通过在HLA-G重链的位置42(Cys42-Cys42键)和147(Cys42-Cys147键)处的两个独特半胱氨酸残基之间生成二硫键来形成二聚体。二聚化具有倾斜的取向,其向上暴露 α 3结构域的HLA-G受体结合位点,使它们更容易被受体接近。因此,HLA-G二聚体以比单体更高的亲和力和更慢的解离速率结合受体,并且也比单体更有效地发出信号。

[0125] 替代名称是HLA-G组织相容性抗原I类或G或MHC-G。在数据库中以下登录号描述了HLA-G:基因ID:3135,UniGene Hs.512152。该蛋白质在UniProt中以登录号:P17693公开。蛋白质和mRNA序列的GenBank条目分别为NP_002118.1和NM_002127.5。

[0126] 比较HLA-G同种型序列时,通常选择HLA-G1作为典型序列,即反映每个位置上最常见的核酸或碱基或氨基酸的DNA、RNA或氨基酸序列,这就是为什么数据库通常以名称“HLA-G”指代该同种型序列的原因。HLA-G2至G7与HLA-G1的区别在于一个或多个氨基酸缺失和/或一个或多个置换。HLA-G人同种型在HLA-G1的Uniprot登录号P17693-1、HLA-G2的P17693-2、HLA-G3的P17693-3、HLA-G4的P17693-4、HLA-G5的P17693-5、HLA-G6的P17693-6、HLA-G7的P17693-7下描述。

[0127] 针对HLA-G同种型的抗体

[0128] 本发明提供了一种抗体,其特异性结合七种HLA-G同种型中的1至6种,优选2至5种HLA-G同种型,但不特异性结合或识别所有HLA-G同种型。例如,抗体可以特异性结合1、2、3、4、5或6种HLA-G同种型。HLA-G同种型可以选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7,优选地选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5和HLA-G6。

[0129] 例如,根据本发明的CAR的抗体或抗原结合结构域可以识别:

[0130] -HLA-G1、HLA-G4和HLA-G5,如果抗体或抗原结合结构域识别的表位在HLA-G的 α 2结构域上,

[0131] -HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5和HLA-G6,如果抗体或抗原结合结构域识别的表位在HLA-G的 $\alpha 3$ 结构域上,

[0132] -HLA-G1和HLA-G5,如果抗体或抗原结合结构域识别的表位在HLA-G的 $\beta 2M$ 结构域上或在特异于与 $\beta 2M$ 结构域缔合的HLA-G的结构域上。

[0133] 在一个特定实施方案中,抗体或其片段不识别所有的HLA-G同种型,即根据本发明的CAR的抗体或抗原结合结构域不识别HLA-G的 $\alpha 1$ 结构域的表位。

[0134] 一方面,抗体可以特异性结合HLA-G1和HLA-G5同种型。然后,抗体基本上不结合其他HLA-G同种型,尤其是HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G6和HLA-G7。更具体地,抗体对与 $\beta 2M$ 缔合的HLA-G同种型具有特异性。在这种情况下,抗体基本上不结合没有 $\beta 2M$ 的HLA-G1和HLA-G5同种型。

[0135] 本文提供了抗体15E7。特别地,15E7是具有如SEQ ID NO:3中公开的重链序列和如SEQ ID NO:4中公开的轻链序列的scFv抗体。根据Kabat,抗体15E7的CDR具有以下序列:

[0136] -SEQ ID NO:11的重链CDR1;

[0137] -SEQ ID NO:12的重链CDR2

[0138] -SEQ ID NO:13的重链CDR3

[0139] -SEQ ID NO:14的轻链CDR1

[0140] -SEQ ID NO:15的轻链CDR2,和

[0141] -SEQ ID NO:16的轻链CDR3。

[0142] 因此,本发明涉及一种抗体,其具有:

[0143] (a) (i) 包含SEQ ID NO:3的重链可变区的CDR 1、2和3的重链和(ii) 包含SEQ ID NO:4的轻链可变区的CDR 1、2和3的轻链;

[0144] (b) (i) 包含分别包含SEQ ID NO:11、12和13的序列的CDR1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的重链,和(ii) 包含分别包含SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的轻链,任选地其中每个CDR可以任选地包含1、2、3或4个氨基酸置换、缺失或插入;或者

[0145] (c) SEQ ID NO:3和4的重链可变区和轻链可变区,或与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:4具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的轻链可变区。

[0146] 所述抗体可以是嵌合的、人的或人源化的。所述抗体可以是选自Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、双抗体、单链抗体片段或包含多个不同抗体片段的多特异性抗体的抗体片段。所述抗体可以与毒性剂或可检测标记缀合或共价结合。

[0147] 另一方面,所述抗体可以特异性结合HLA-G2和HLA-G6同种型。然后,抗体基本上不结合其他HLA-G同种型,特别是与 $\beta 2M$ 亚基缔合的同种型,例如HLA-G1、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5和HLA-G7。更具体地,所述抗体对无 $\beta 2M$ 的HLA-G同种型具有特异性,并特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或无 $\beta 2M$ 的HLA-G1和无 $\beta 2M$ 的HLA-G5同种型。

[0148] 本文提供了抗体LFTT-1。特别地,LFTT-1是具有如SEQ ID NO:1中公开的重链序列和如SEQ ID NO:2中公开的轻链序列的scFv抗体。抗体LFTT-1的CDR具有以下序列(根据Kabat):

[0149] -SEQ ID NO:5的重链CDR1;

[0150] -SEQ ID NO:6的重链CDR2

[0151] -SEQ ID NO:7的重链CDR3

[0152] -SEQ ID NO:8的轻链CDR1

[0153] -SEQ ID NO:9的轻链CDR2,和

[0154] -SEQ ID NO:10的轻链CDR3。

[0155] 因此,本发明涉及一种抗体,其具有:

[0156] (a) (i) 包含SEQ ID NO:1的重链可变区的CDR 1、2和3的重链和(ii) 包含SEQ ID NO:2的轻链可变区的CDR 1、2和3的轻链;

[0157] (b) (i) 包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7的序列的CDR 1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的重链,以及(ii) 包含分别包含SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的轻链,任选地其中每个CDR可以任选地包含1、2、3或4个氨基酸置换、缺失或插入;或者

[0158] (c) SEQ ID NO:1和2的重链可变区和轻链可变区,或与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的轻链可变区。

[0159] 所述抗体可以是嵌合的、人的或人源化的。所述抗体可以是选自Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、双抗体、单链抗体片段或包含多个不同抗体片段的多特异性抗体的抗体片段。所述抗体可以与毒性剂或可检测标记缀合或共价结合。

[0160] 在一个特定实施方案中,抗体是多特异性抗体,优选双特异性抗体。双特异性抗体包含识别相同或不同抗原上的两个不同表位的两个不同的F(ab)片段。特别地,根据本发明的双特异性抗体结合相同的HLA-G同种型或不同的HLA-G同种型上的不同表位。优选地,双特异性抗体特异性结合不同的HLA-G同种型,并包含识别HLA-G/无 β 2M同种型的F(ab)和识别与 β 2M结构域缔合的HLA-G同种型的第二F(ab)。

[0161] 在一个实施方案中,双特异性抗体包含一个F(ab),其特异性结合无 β 2M的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型,以及另一个F(ab),其特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5同种型。在该特定实施方案中,双特异性抗体包含来自具有上文描述的CDR(SEQ ID NO:5-10)的LFTT-1抗体的一个F(ab)和具有上文描述的CDR(SEQ ID NO:11-16)的15E7抗体的一个F(ab)。

[0162] 在另一个实施方案中,双特异性抗HLA-G抗体包含由Fc(铰链-CH2-CH3)、其后是第一抗体(抗体1)Fab重链(CH1-VH)和连续的第二抗体(抗体2)的Fab重链(CH1-VH)(后者通过多肽接头序列连接)构成的连续重链。在蛋白质表达过程中,所得的重链组装成二聚体,而共表达的抗体1和抗体2轻链(VL-CL)与它们的同源重链缔合,以形成最终的串联F(ab)'₂-Fc分子。优选地,抗体1和抗体2是不同的,优选地分别是LFTT-1抗体和15E7抗体。

[0163] 在一个实施方案中,抗体或其片段不结合或识别所有HLA-G同种型。特别地,特异性结合一种或几种但不是全部HLA-G同种型的抗体或其片段具有至少 10^{-6} M的K_d亲和常数。在某些方面,所述抗体或其片段以至少约 10^{-7} M,以及优选至少约 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M的高亲和力结合一种或几种但不是全部HLA-G同种型。

[0164] 在一个特定实施方案中,抗体或其片段不结合或识别HLA-G同种型的 α 1结构域。这

意味着这样的抗体或其片段可以结合或识别缺乏 α -1结构域的HLA-G同种型,例如Tronik-Le Roux等人,Molecular Oncology 11 (2017) 1561-1578中描述的HLA-G同种型,其包含 α 2和 α 3结构域或仅包含 α 3结构域。例如,这样的抗体或其片段可以结合 α 2、 α 3或 β 2M结构域。

[0165] 根据本发明的抗体或抗体片段的序列可以用于制备CAR或制备药物组合物的方法中。可替代地,根据本发明的抗体或抗体片段可以用于在诊断测试例如免疫测定中检测一种或多种HLA-G同种型。

[0166] 抗体或抗体片段可以例如通过免疫测定法例如放射免疫测定法(RIA)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)和表面等离子体共振(SPR)测定法或本领域技术人员已知的其他技术来鉴定。

[0167] 优选地,特异性结合一种或多种HLA-G同种型的抗体(包括其抗体片段)不与其他抗原显著交叉反应(即,在常规免疫测定中不可检测到)。当抗体以比任何交叉反应抗原更高的亲和力结合抗原时,所述抗体特异性结合抗原,如使用实验技术(例如蛋白质印迹(WB),放射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定(ELISA),尤其是竞争性ELISA)所确定的。

[0168] 针对HLA-G同种型的嵌合抗原受体(CAR)

[0169] CAR通常包含胞外结构域(细胞外结构域)和胞内结构域(胞质结构域),优选通过铰链结构域和跨膜结构域连接。特别地,根据本发明的CAR任选地包含可裂解的接头和报告分子。在细胞表面表达的胞外结构域包含抗原结合结构域或受体结构域,任选地指导抗原结合结构域进入内质网用于加工的信号肽。胞外结构域包含特异性识别靶抗原的抗原结合结构域。作为非限制性实例,抗原结合结构域可以是抗体,优选单链抗体,例如scFv。间隔区将抗原结合结构域与跨膜结构域连接,并且被设计为足够柔性以允许抗原结合结构域以允许抗原识别的方式定向。跨膜结构域通常是跨细胞膜脂质双层的疏水性 α 螺旋。CAR的胞内结构域由信号传递肽组成,该信号传递肽在细胞内将活化信号扩散到胞质,从而刺激CAR表达细胞。胞内结构域可包括几个信号传导结构域,如下文所解释的。

[0170] 在一些实施方案中,CAR至少包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞质信号传导结构域,所述胞质信号传导结构域包含衍生自如下文定义的刺激分子和/或共刺激分子的功能性信号传导结构域。在一些实施方案中,该组多肽包括二聚化开关,在存在二聚化分子时,该二聚化开关可以使多肽彼此偶联,例如可以将抗原结合结构域与细胞内信号传导结构域偶联。一方面,胞质信号传导结构域还包含一个或多个衍生自至少一种如下文定义的共刺激分子的功能性信号传导结构域。

[0171] 一方面,CAR包含嵌合融合蛋白,其包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包含衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面,CAR包含嵌合融合蛋白,其包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包含衍生自共刺激分子的功能性信号传导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。

[0172] 优选地,CAR包含嵌合融合蛋白,其包含细胞外抗原结合结构域、任选地铰链结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的,所述细胞内信号传导结构域包含衍生自一种或多种共刺激分子的两个功能性信号传导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面,CAR在CAR融合蛋白的氨基末端(N-末端)包含任选的前导序列或肽信号序列。

[0173] 在一个特定实施方案中,CAR进一步包含可裂解的接头和报告分子(优选连续地在

CAR融合蛋白的羧基末端(C-末端)),以促进从试图用根据本发明的CAR转染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。根据本发明,工程改造的CAR具有1、2、3、4、5、6、7、8或更多个组分,并且在一些实施方案中,至少一个组分促进免疫细胞靶向或结合至特定的一种或多种HLA-G同种型。优选地,该至少一个组分衍生自如先前部分所定义的单克隆抗体。优选地,该组分是scFv。

[0174] 优选地,抗HLA-G CAR从N至C端顺序地包含以下或由以下组成:任选地肽信号序列,抗HLA-G抗体或其片段,优选地抗HLA-GscFv,间隔结构域,跨膜结构域,至少一个细胞内结构域,可裂解的接头和截短的人CD19报告分子。所有这些组分将在下面更具体地描述。

[0175] 特别地,根据本发明的CAR,特别是根据本发明的抗原结合结构域、抗体或scFv,可以特异性结合1至6种,优选2至5种HLA-G同种型,更优选特异性结合一种或两种HLA-G同种型或两种或三种HLA-G同种型,但不特异性结合所有HLA-G同种型。例如,CAR可以特异性结合1、2、3、4、5或6种HLA-G同种型。HLA-G同种型可以选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7,优选地选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5和HLA-G6。

[0176] 一方面,CAR可以特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型,例如HLA-G1和HLA-G5同种型。然后,CAR基本上不结合其他HLA-G同种型,尤其是HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G6和HLA-G7。更具体地,CAR特异于与 β 2M缔合的HLA-G同种型。在这种情况下,CAR基本上不结合没有 β 2M的HLA-G1和HLA-G5同种型。

[0177] 另一方面,CAR可以特异性结合HLA-G2和HLA-G6同种型。然后,CAR基本上不结合其他HLA-G同种型,特别是HLA-G1、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5和HLA-G7。更具体地,CAR对无 β 2M的HLA-G同种型具有特异性,并且可以特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型。

[0178] 抗原结合结构域

[0179] 根据本发明的CAR的外部结构域是抗原结合结构域。特别地,该抗原结合结构域衍生自以上部分所定义的抗体。

[0180] CAR分子的抗原靶向或抗原识别通常涉及使用由单克隆抗体组装而成的单链可变片段(scFv)。然而,替代的靶向部分包括配体(Altenschmidt等人,(1996) Clin. Cancer Res. 2:1001-8; Muniappan, 等人,(2000) Cancer Gene Ther. 7:128-134), 肽(Pameijer等人,(2007) Cancer Gene Ther. 14:91-97), 嵌合配体(Davies等人,(2012) Mol. Med. 18:565-576), 受体衍生物(Zhang等人,(2012) J Immunol. 189:2290-9) 和单结构域抗体(Sharifzadeh等人,(2012) Cancer Res. 72:1844-52)。特异性地识别并结合靶抗原特别是如上文所定义的HLA-G同种型的任何期望的抗体或其抗体片段可以被掺入根据本发明的CAR中。

[0181] 在一个实施方案中,这种抗原结合结构域是抗体,优选单链抗体。优选地,抗体是人源化抗体或非人源化鼠抗体。特别地,这样的抗原结合结构域是选自片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、单链抗体片段、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体(例如sdAb, sdFv, 纳米抗体)片段、双抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体的抗体片段。在特定实施方案中,抗体是单链抗体片段,其包含可变重链区和/或可变轻链区,例如scFv。特别地,这种抗原结合结构域选自Fab和scFv。

[0182] 抗体片段可以通过多种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通

过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,抗体是重组产生的片段,例如包含非天然存在的排列的片段,例如具有通过合成接头(例如肽接头)连接的两个或多个抗体区域或链的那些片段,和/或可以不通过天然存在的完整抗体的酶消化产生的片段。在一些方面,抗体片段是scFv。

[0183] 在其中抗原靶向结构域是scFv的实施方案中,scFv可以衍生自通过柔性接头连接的抗原特异性mAb的可变重链(VH)和可变轻链(VL)区域。scFv与其衍生自的完整抗体保持相同的特异性和相似的亲和力(Muniappan等人,(2000)Cancer Gene Ther.7:128-134)。可以使用多种制备scFv的方法,包括在US 4,694,778;Bird等人,(1988)Science 242:423-442;Ward等人,(1989)Nature 334:54454;和Skerra等人,(1988)Science 242:1038-1041中所述的方法。在某些实施方案中,scFv可以是人源化的或是完全人scFv。

[0184] 特异性结合HLA-G的特定同种型的抗原结合结构域可以与相关抗原交叉反应,例如与1-5种,优选2-4种其他不同的HLA-G同种型交叉反应。

[0185] 在一些方面,抗原结合结构域可以衍生自具有一个或多个指定功能特征(例如结合特性,包括与特定表位的结合,例如与其他抗体的那些表位相似或重叠的表位,与其他抗体竞争结合的能力和/或特定的结合亲和力)的抗体或其片段。在一些实施方案中,与靶抗原阴性细胞相比,抗原结合结构域、包含其的CAR和包含此类CAR的细胞表现出对表达靶抗原的细胞的结合偏好。在一些实施方案中,观察到结合偏好,其中与非表达细胞相比,对于表达抗原的细胞测量到明显更高的结合程度。在一些情况下,观察到的与靶抗原或表达抗原的细胞的结合的总程度大致相同,至少与对于非抗原特异性结构域、CAR或细胞所观察到的一样大或更大。在所提供的任何实施方案中,结合性质(例如亲和力或竞争性)的比较可以通过本领域已知的例如如上文所述的测定法的测量来进行。

[0186] 在另一个实施方案中,CAR的抗原结合结构域以至少 10^{-6} M的Kd亲和常数特异性结合一种或多种HLA-G同种型。在某些方面,CAR的抗原结合结构域以至少约 10^{-7} M,优选至少约 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M的高亲和力结合一种或几种HLA-G同种型。优选地,CAR的抗原结合结构域以约 10^{-9} M的亲和力结合一种或多种HLA-G同种型。

[0187] 一方面,CAR的抗原结合片段可以特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型。然后,CAR的抗原结合片段基本上不结合其他HLA-G同种型,特别是与 β 2M缔合的HLA-G1和HLA-G5同种型、HLA-G3、HLA-G4和HLA-G7。更具体地,CAR的抗原结合片段特异于无 β 2M的HLA-G同种型,并且基本上不结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型。

[0188] 在一个特定实施方案中,CAR的抗原结合片段包含:i)重链可变区,其包含SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列;和/或

[0189] (ii)轻链可变区,其包含SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列。

[0190] 在另一个特定实施方案中,CAR的抗原结合片段包含(i)包含SEQ ID NO:1的重链可变区的CDR 1、2和3的重链,和(ii)包含SEQ ID NO:2的轻链可变区的CDR 1、2和3的轻链。

[0191] 在另一个特定实施方案中,CAR的抗原结合片段包含(i)包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7的序列的CDR 1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的重链,(ii)包含分别包含SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的轻链,任选地其中每个CDR可以任选

地包含1、2、3或4个氨基酸置换、缺失或插入。

[0192] 另一方面, CAR的抗原结合片段可以特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型, 例如HLA-G1和HLA-G5同种型。然后, CAR的抗原结合片段基本上不结合其他HLA-G同种型, 特别是无 β 2M的同种型, 例如HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G6和HLA-G7。在这种情况下, CAR的抗原结合片段基本上不结合没有 β 2M的HLA-G1和HLA-G5同种型。

[0193] 在一个特定实施方案中, CAR的抗原结合片段包含: i) 重链可变区, 其包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列; 和/或

[0194] (ii) 轻链可变区, 其包含SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:4具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列。

[0195] 在另一个特定实施方案中, CAR的抗原结合片段包含 (i) 包含SEQ ID NO:3的重链可变区的CDR 1、2和3的重链和 (ii) 包含SEQ ID NO:4的轻链可变区的CDR 1、2和3的轻链。

[0196] 在另一个特定实施方案中, CAR的抗原结合片段包含 (i) 包含分别包含SEQ ID NO:11、12和13的序列的CDR 1、2和3 (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 的重链, (ii) 包含分别包含SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3 (LCDR1、LCDR2、LCDR3) 的轻链, 任选地其中每个CDR可以任选地包含1、2、3或4个氨基酸置换、缺失或插入。

[0197] 特别地, CAR的抗原结合片段不结合或识别所有HLA-G同种型。

[0198] 在一个实施方案中, CAR的抗原结合片段不结合或识别HLA-G同种型的 α 1结构域。这意味着这样的抗原结合片段可以识别缺少 α -1结构域的HLA-G同种型, 例如Tronik-Le Roux等人, Molecular Oncology 11(2017) 1561-1578中所描述的HLA-G同种型, 其包含 α 2和 α 3结构域或仅包含 α 3结构域。例如, 这样的抗原结合片段可以结合 α 2、 α 3或 β 2M结构域。

[0199] 在一个特定实施方案中, 抗原结合结构域是多特异性抗原结合结构域, 优选双特异性抗原结合结构域。例如, 双特异性抗原结合片段包含识别HLA-G/无 β 2M同种型的结构域和识别与 β 2M结构域缔合的HLA-G同种型的第二结构域。甚至更优选地, 双特异性抗原结合结构域包含特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型的一个结构域, 和特异性结合与 β 2M亚基缔合的HLA-G1和HLA-G5同种型的另一个结构域。优选地, 双特异性抗原结合片段衍生自具有上述CDR (SEQ ID NO:5-10) 的LFTT-1抗体和具有上述CDR (SEQ ID NO:11-16) 的15E7抗体。

[0200] 在一个特定实施方案中, CAR的抗原结合片段是双特异性抗原结合结构域, 其包含 (i) 包含分别包含SEQ ID NO:11、12和13的序列的CDR 1、2和3 (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 的结构域, (ii) 包含分别包含SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3 (LCDR1、LCDR2、LCDR3) 的结构域, (iii) 包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7的序列的CDR 1、2和3 (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 的结构域, 以及 (iv) 包含分别包含SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3 (LCDR1、LCDR2、LCDR3) 的结构域, 任选地其中每个CDR可以任选地包含1、2、3或4个氨基酸置换、缺失或插入。

[0201] 此类适用于CAR的双特异性抗原结合结构域可以是例如串联scFv或纳米抗体 (De Munter等人, Molecular Sciencess 2018)。

[0202] 在一些实施方案中, 抗原结合结构域包含scFv, 其包含抗HLA-G单克隆抗体的CDR序列。CDR可以使用常规方法确定。给定的CDR或FR的精确氨基酸序列边界可以使用许多众所周知的方案中的任何一种容易地确定, 包括Kabat等人, (1991), "Sequences of

Proteins of Immunological Interest,”第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md. (“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948 (“Chothia”编号方案),MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996) ,“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography,” J.Mol.Biol.262,732-745.” (“Contact”编号方案),Lefranc M P等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”Dev Comp Immunol,2003年1月;27(1):55-77 (“IMGT”编号方案),和Honegger A和Pluckthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool,”J Mol Biol,2001年6月8日;309(3):657-70, (“Aho”编号方案)所描述的那些。

[0203] 在特定实施方案中,抗原结合结构域是单链可变片段(scFv)。scFv还可包含肽接头。连接scFv V_H 和 V_L 结构域的肽接头将一个可变区结构域的羧基末端连接到另一个可变结构域的氨基末端,而不损害 V_H - V_L 配对的保真度和抗原结合位点。肽接头的长度可以在10到30个氨基酸之间变化。在一个实施方案中,scFv肽接头是Gly/Ser接头,并且包含氨基酸序列Gly-Gly-Gly-Ser或Gly-Gly-Gly-Gly-Ser的一个或多个重复序列。在一个实施方案中,柔性多肽接头包括但不限于 $(Gly_3Ser)_3$ 和 $(Gly_4Ser)_3$ 。

[0204] 跨膜和铰链结构域

[0205] 铰链结构域

[0206] 当T细胞与抗原呈递细胞相互作用时,形成膜间距离为约15nm的免疫突触。该距离由TCR和肽-MHC复合物的结构决定。这种空间分离对于磷酸化级联和T细胞活化的有效触发很重要。当人为地缩短时,该蛋白有机会停留在突触内,导致活化信号的抑制。

[0207] 假设特定scFv识别的表位在靶细胞表面上的位置通常是固定的,则需要调整CAR中细胞外间隔子(铰链模块)的长度和刚度,以确保与scFv的最大空间相容性和紧密突触的形成。在一些方面,免疫球蛋白恒定区的一部分充当抗原结合结构域(例如scFv)和跨膜结构域之间的间隔区。与间隔子不存在的情况下相比,间隔子可以具有在抗原结合后提供增加的细胞响应性的长度。间隔结构域优选具有促进CAR与抗原结合并增强细胞中信号传导的序列。预期促进结合的氨基酸的实例包括半胱氨酸、带电荷的氨基酸以及潜在的糖基化位点中的丝氨酸和苏氨酸,并且这些氨基酸可用作构成间隔结构域的氨基酸。

[0208] 在一些实施方案中,CAR包含在抗原结合结构域和跨膜结构域之间和/或在跨膜结构域和胞质结构域之间的铰链序列。铰链结构域的长度可以是多至150个氨基酸,优选10至100个氨基酸,甚至更优选50至100个氨基酸。本领域普通技术人员将理解,铰链序列是促进柔性的氨基酸的短序列(参见,例如,Woof等人,Nat.Rev.Immunol,4(2):89-99(2004))。铰链序列可以是任何合适的分子衍生或获得的任何合适的序列。在一些实施方案中,可以基于CAR和结合表位之间的距离来优化铰链序列的长度,例如,更长的铰链对于膜近端表位可能是最佳的。

[0209] 铰链可衍生自或包括免疫球蛋白Fc区(例如,IgG1 Fc区、IgG2Fc区、IgG3 Fc区、IgG4 Fc区、IgE Fc区、IgM Fc区或IgA Fc区)的至少一部分。在某些实施方案中,铰链结构域包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgM或IgA免疫球蛋白Fc区的落入其CH2和CH3结构域内的至少一部分。在一些实施方案中,间隔结构域也可包括相应免疫球蛋白铰链区的至少一

部分。在一些实施方案中,铰链衍生自或包括经修饰的免疫球蛋白Fc区(例如,经修饰的IgG1 Fc区、经修饰的IgG2 Fc区、经修饰的IgG3 Fc区、经修饰的IgG4 Fc区、经修饰的IgE Fc区、经修饰的IgM Fc区或经修饰的IgA Fc区)的至少一部分。经修饰的免疫球蛋白Fc区可具有一个或多个突变(例如,点突变,插入,缺失,重复),从而导致一个或多个氨基酸置换、修饰或缺失,其导致间隔结构域与Fc受体(FcR)的受损的结合。在一些方面,经修饰的免疫球蛋白Fc区可以被设计为具有一个或多个突变,所述突变导致引起间隔结构域与一个或多个FcR(包括但不限于FcγRI、FcγR2A、FcγR2B1、FcγR2B2、FcγR3A、FcγR3B、FcεRI、FcεR2、FcαRI、Fcα/μK或FcRn)的受损的结合的一个或多个氨基酸置换、修饰或缺失。

[0210] 示例性的铰链包括但不限于CD8a铰链,CD28铰链,IgG1/IgG4(铰链-Fc部分)序列(在单个研究中,CD4、CD7和IgD),单独的IgG4铰链,与CH2和CH3结构域连接的IgG4铰链或与CH3结构域连接的IgG4铰链,描述于Hudecek等人,(2013)Clin.Cancer Res.,19:3153、国际专利申请公开号W02014031687、美国专利号8,822,647或已发布申请号US2014/0271635中的那些。作为铰链结构域,本发明涉及可以使用CD8a(GenBank登录号NP_001759.3)的残基118至178、CD8(GenBank登录号AAA35664)的残基135至195,CD4(GenBank登录号NP_000607.1)的残基315至396或CD28(GenBank登录号NP_006130.1)的残基137至152的全部或部分。另外,作为间隔结构域,可以使用抗体H链或L链的恒定区(CH1区或CL区)的一部分。此外,间隔结构域可以是人工合成的序列。特别地,根据本发明的CAR包含选自CD8a、CD28和IgG1/IgG4(铰链-Fc部分)序列(在单个研究中,CD4、CD7和IgD)的铰链。该选择基于以下事实:这些序列相对中性、柔性并且在结构上已经很好地表征。

[0211] 优选地,铰链结构域包含以下或由以下组成:(i) CD28铰链,(ii) CD8α铰链,(iii) 人IgG4铰链结构域,(iv) 人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域或(v) 突变的CH2人IgG4结构域,人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域。甚至更优选地,铰链结构域包含以下或由以下组成:(a) SEQ ID NO:18,(b) SEQ ID NO:19,(c) SEQ ID NO:25,(d) SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:27,或(e) SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27,或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列。

[0212] 在一个实施方案中,铰链结构域包含以下或由以下组成:(i) 人IgG4铰链结构域,(ii) 人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域,或(iii) 突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域。特别地,铰链结构域从N末端到C末端顺序地包含以下或由以下组成:(i) 人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域或(ii) 突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域。

[0213] 在一个实施方案中,根据本发明的CAR包含间隔结构域,其包含人IgG4铰链结构域或由其组成,所述人IgG4铰链结构域包含SEQ ID NO:25所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的序列或由其组成。

[0214] 在另一个实施方案中,根据本发明的CAR包含间隔结构域,其包含以下或由以下组成:(i) CH3人IgG4结构域,其包含SEQ ID NO:27所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的序列或由其组成,和(ii) 人IgG4铰链结构域,其包含SEQ ID NO:25所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的序列或由其组成。

[0215] 在一个实施方案中,根据本发明的CAR进一步包含突变的CH2人IgG4结构域,其中

在CH2人IgG4结构域中的突变由氨基酸EFLG (113-116) PVA和N177Q的突变组成,例如如Watanabe等人,Oncoimmunology.2016;5(12):e1253656中所公开的。优选地,突变的CH2人IgG4结构域包含SEQ ID NO:26所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的序列或由其组成。

[0216] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的CAR包含铰链结构域,该铰链结构域顺序地包含以下或由以下组成:(i)突变的CH2人IgG4结构域,其包含SEQ ID NO:26所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的序列或由其组成,(ii)CH3人IgG4结构域,其包含SEQ ID NO:27所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的序列或由其组成,以及(iii)人IgG4铰链结构域,其包含SEQ ID NO:25所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的序列或由其组成。

[0217] 特别地,根据本发明的CAR包含CD8a铰链结构域,其优选包含SEQ ID NO:18的序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0218] 根据本发明的另一种特定的CAR包含CD28铰链结构域,其优选包含SEQ ID NO:19的序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0219] 跨膜结构域

[0220] 跨膜模块用于将受体锚定在细胞表面。关于跨膜结构域,可以将CAR设计为包含与CAR的抗原结合结构域融合的跨膜结构域。特别地,可以将CAR设计为包含与CAR的抗原结合结构域和胞内结构域融合的跨膜结构域。

[0221] 在一个实施方案中,使用天然与CAR中的结构域之一缔合的跨膜结构域。在一些情况下,可以通过氨基酸置换来选择或修饰跨膜结构域,以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。跨膜结构域可以衍生自天然来源或合成来源。如果来源是天然的,则该结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。通常,跨膜结构域表示跨膜蛋白(也称为整合蛋白)的单个跨膜螺旋。该结构域通常包括CD3 ζ 、CD28、CD8、FcRI γ 的跨膜序列和更不频繁地包含CD4、CD7、OX40和MHC (H2-Kb) 的跨膜序列,该选择取决于相邻的间隔子和细胞内序列。基于CD3 ζ 和FcRI γ 的跨膜模块确保将CAR有效掺入内源性TCR中。例如,WO 2008/045437的CAR描述了衍生自人CD8 α 或CD28的跨膜部分,以及特别是在氨基酸位置135至205、135至203或135至182(根据UniProtKB/Swiss-Prot P01732的氨基酸编号)处具有未修饰的CD8铰链区的嵌合T细胞受体蛋白,其各自在位置164和181处包含半胱氨酸残基。WO95/30014使用具有氨基酸位置132至191(根据UniProtKB/Swiss-Prot P01731的氨基酸编号)的未经修饰的鼠CD8铰链区,其在位置178处包含半胱氨酸残基。特别地,US2008/0260738使用具有氨基酸位置131至170或136至169(根据UniProtKB/Swiss-Prot P01732的氨基酸编号)的经修饰的CD8铰链区,其中位置164处的半胱氨酸被丝氨酸置换。因此,本领域技术人员将知道根据CAR结构域特征选择哪种跨膜结构域。

[0222] 在本发明中特别使用的跨膜区可以衍生自(即至少包含一个或多个以下的跨膜区)CD28,CD3 ϵ ,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD45,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154,TCR α ,TCR β ,H2-Kb,Fc ϵ RI γ ,GITR或CD3 ζ 和/或可以使用含有其功能变体的跨膜区,例如保留其实质部分的结构(例如跨膜)特性的那些。参见,例如Kahlon等人,(2004)

Cancer Res.64:9160-9166;Schambach等人,(2009)Methods Mol.Biol.506:191-205;Jensen等人,(1998)Biol.Blood Marrow Transplant 4:75-83;Patel等人,(1999)Gene Ther.6:412;Song等人,(2012)Blood119:696-706;Carpenito等人,(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.USA106:3360-5;Hombach等人,(2012)Oncoimmunology 1:458-66)和Geiger等人,(2001)Blood 98:2364-71。

[0223] 可替代地,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,它将主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。优选将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。本发明的跨膜结构域在膜中是热力学稳定的。它可以是单个 α 螺旋、跨膜 β 桶、短杆菌肽A的 β 螺旋或任何其他结构。

[0224] 任选地,短的寡肽或多肽接头(优选长度为2至10个氨基酸)可以形成CAR的跨膜结构域和一个或多个细胞内信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体可提供合适的接头。

[0225] 在一个实施方案中,CAR的跨膜结构域选自CD3 ζ 、CD28、CD8、FcRI γ 、CD4、CD7、OX40和MHC(H2-Kb)跨膜结构域。优选地,根据本发明的CAR的跨膜结构域选自CD8和CD28跨膜结构域。甚至更优选地,根据本发明的CAR的跨膜结构域是CD28跨膜结构域,其优选包含SEQ ID NO:20的序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0226] 细胞内结构域

[0227] 在某些实施方案中,胞质或细胞内信号传导结构域,例如衍生自T细胞受体 ζ 链的那些,被用作嵌合受体的至少一部分,以便在嵌合受体与靶抗原接合后产生用于T淋巴细胞增殖和效应功能的刺激信号。

[0228] CAR的信号传导模块的作用是一旦细胞外结构域识别出抗原,就将活化信号转导至免疫细胞。在T细胞中,活化始于TCR复合物的CD3 ζ 亚基的胞质部分中免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的磷酸化。因此,在迄今为止实施的大多数CAR设计中,来自CD3 ζ 的信号传导序列被用作触发细胞裂解活性的模块。

[0229] 仅包含CD3 ζ 链的第一代CAR仅向细胞发送活化信号。这导致了针对肿瘤细胞的细胞毒性反应,但并未提供活化的CAR T细胞的增强的增殖。原则上,增殖信号可能潜在地由CAR T细胞上存在的天然共受体提供;然而,许多肿瘤不表达相应的配体。因此,第二代CAR包含额外包含与CD3 ζ 融合在一起的共刺激性CD28结构域的胞质结构域,以克服这一困难。这种CAR设计既向T细胞提供活化信号,又向其提供增殖信号;结果,细胞被活化、破坏靶细胞并增殖。除了CD28以外,还在CAR中成功测试了来自共刺激受体(例如CD134(TNFRSF4, OX40),CD154(CD40L),CD137(4-1BB),ICOS(CD278),CD27,CD244(2B4))的信号传导序列。

[0230] 第三代CAR是基于组合两个或多个共刺激序列(例如4-1BB-CD28-CD3 ζ)。这些受体分泌更广泛范围的细胞因子(包括TNF α 、GM-CSF和IFN γ),对活化诱导的细胞死亡较不敏感,并且在小鼠模型中显示出更高的肿瘤消除功效。例如,可以使用一个或多个胞内结构域,因为所谓的第三代CAR具有融合在一起的至少2或3个信号传导结构域以用于产生加和或协同作用。

[0231] 如上所述,本发明的CAR可以是第一代、第二代或第三代CAR。优选地,CAR是第二代或第三代CAR。甚至更优选地,当由T细胞表达时,CAR是第三代CAR,而当由NK或NKT细胞表达时,CAR是第一代CAR。

[0232] 在一些实施方案中,当存在于同一分子内的细胞外抗原靶向结构域结合抗原时,细胞内信号传导胞内结构域将信号传递到细胞中。

[0233] T细胞活化通过两种不同的胞质信号传导胞内结构域进行传递,即用于通过TCR复合物启动抗原依赖性初级活化的序列(初级胞质信号传导胞内结构域)和用于以抗原非依赖性方式发挥作用以提供次级或共刺激信号的序列(次级胞质信号传导胞内结构域或共刺激胞内结构域)。因此,尽管一些实施方案包括仅具有初级胞质信号传导胞内结构域的CAR,但在其他实施方案中,本发明的CAR包括初级信号传导胞内结构域和次级胞质信号传导胞内结构域。

[0234] 本发明的CAR的细胞内信号传导结构域触发或引发其中已经放置了CAR的免疫细胞的至少一种正常效应功能的活化。术语“效应功能”是指细胞的专门功能。T细胞的效应功能可以是例如细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。尽管通常可以使用整个细胞内信号传导结构域,但是在许多情况下,不必使用整个链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言,只要其转导效应功能信号,就可以使用这样的截短部分代替完整链。因此,术语细胞内信号传导结构域意在包括足以转导效应功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0235] 在本发明中特别使用的细胞内结构域序列的实例包括衍生自淋巴细胞受体链、TCR/CD3复合蛋白、Fc受体亚基、IL-2受体亚基、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CD278(ICOS)、Fc ϵ RI、DAP10和DAP12的细胞内信号传导结构域的那些。特别优选地,本发明的CAR中的细胞内信号传导结构域包含衍生自CD3 ζ 的胞质信号传导序列。具体地,ITAM的实例包括CD3(GenBank登录号NP_932170)的残基51至164,Fc ϵ RI γ (GenBank登录号NP_004097)的残基45至86,Fc ϵ RI(GenBank登录号NP_000130)的残基201至244,CD3 γ (GenBank登录号NP_000064)的残基139至182,CD3 δ (GenBank登录号NP_000723)的残基128至171,CD3 ϵ (GenBank登录号NP_000724)的残基153至207,CD5(GenBank登录号NP_055022)的残基402至495,CD22(GenBank登录号NP_001762)的残基707至847,CD79a(GenBank登录号NP_001774)的残基166至226,CD79b(GenBank登录号NP_000611)的残基182至229和CD66d(GenBank登录号NP_001806)的残基177至252及其变体。参考的残基基于来自GenBank的氨基酸序列信息,并且基于每种蛋白质的前体全长(包括信号肽序列等)。用于本发明的CAR的细胞内信号传导结构域的优选实例包括T细胞受体(TCR)和协同作用以在抗原受体接合后启动信号转导的共受体的胞质序列,以及这些序列的任何衍生物或变体以及具有相同功能能力的任何合成序列。

[0236] 在一个优选的实施方案中,可以将CAR的胞质结构域设计成单独包含CD3 ζ 信号传导结构域,或者与在本发明的CAR的背景下有用的任何其他期望的一个或多个胞质结构域组合。在一个特定方面,本发明的CAR包含CD3 ζ 信号传导结构域,其优选包含SEQ ID NO:22的序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0237] CAR的胞质结构域可包含CD3 ζ 链部分和共刺激信号传导区域。共刺激信号传导区域是指CAR的一部分,其包含共刺激分子的细胞内结构域。

[0238] 可用于本发明的共刺激分子的实例包括I类MHC分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、To11配体受体、B7-H3、BAFFR、BTLA、BLAME(SLAMF8)、CD2、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8、CD11a、

LFA-1 (CD11a/CD18)、CD11b、CD11c、CD11d、CD18、CD19、CD19a、CD27、CD28、CD29、CD30、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD84、CD96 (Tactile)、CD100 (SEMA4D)、CD103、CRTAM、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、SLAM (SLAMF1、CD150、IP0-3)、CD160 (BY55)、SELPLG (CD162)、DNAM1 (CD226)、Ly9 (CD229)、SLAMF4 (CD244、2B4)、ICOS (CD278)、CEACAM1、CDS、CRTAM、DAP10、GADS、GITR、HVEM (LIGHTR)、IA4、ICAM-1、IL2R β 、IL2R γ 、IL7Ra、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAT、LFA-1、LIGHT、LTBR、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRP1)、PAG/Cbp、PD-1、PSGLI、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNFR2、TRANCE/RANKL、VLA-1、VLA-6、与CD83特异性结合的配体等。

[0239] 刺激性配体在本领域中是众所周知的,并且尤其包括装载有肽的I类MHC分子、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体和超激动剂抗CD2抗体。

[0240] 在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含选自淋巴细胞受体链、TCR/CD3复合蛋白、Fc受体亚基、IL-2受体亚基、CD3、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CD278 (ICOS)、Fc ϵ RI、DAP10和DAP12的细胞内信号传导结构域的至少一个细胞内结构域。

[0241] 在一个实施方案中,根据本发明的CAR的共刺激结构域选自CD28、CD134 (TNFRSF4、OX40)、CD154 (CD40L)、CD137 (4-1BB)、ICOS (CD278)、CD27、CD244 (2B4)、CD149、DAP10、CD30、IL2-R、IL7r6、IL21-R、NKp30、NKp44、CD27和DNAM-1。这些不同的共刺激结构域产生不同的细胞因子谱,其进而可能对靶细胞介导的细胞毒性和肿瘤微环境产生影响。特别地,共刺激结构域与CD3 ζ 融合在一起。在一个实施方案中,根据本发明的CAR的共刺激结构域选自CD28、4-1BB和OX40。

[0242] 尽管可以在本发明的CAR中使用任何合适的胞内结构域,但是在某些实施方案中,本发明具体地考虑了将4-1BB和CD3 ζ 的全部或部分胞内结构域用作细胞内结构域。本发明的CAR的细胞内信号传导结构域内的胞质信号传导序列可以以随机或指定的顺序彼此连接。在包含多于一个细胞内胞内结构域的CAR中,如上所述的寡肽接头或多肽接头可插入细胞内胞内结构域之间以连接结构域。任选地,短的寡肽或多肽接头(优选长度为2至10个氨基酸)可以形成连接。甘氨酸-丝氨酸双联体或连续序列提供了特别合适的接头。特别地,肽接头可以是(Gly)₃-Ser接头或其任何重复序列,例如其二联体或三联体。

[0243] 如本文所用,术语“4-1BB共刺激信号传导区域”是指与该名称相关的特定蛋白质片段和具有相似生物学功能的任何其他分子,其与SEQ ID NO:21所示的4-1BB共刺激信号传导区域序列具有至少70%或可替代地至少80%的氨基酸序列同一性,优选90%的序列同一性,更优选至少95%的序列同一性。4-1BB共刺激信号传导区域的实例序列在US 20130266551A1中提供。

[0244] CD28共刺激信号传导结构域的序列的实例在美国专利号5,686,281;Geiger,T.L.等人,Blood 98:2364-2371(2001);Hombach A.等人,J Immunol 167:6123-6131(2001);Maher J.等人,Nat Biotechnol20:70-75(2002);Haynes N.M.等人,J Immunol 169:5780-5786(2002);Haynes N.M.等人,Blood 100:3155-3163(2002)中提供。

[0245] OX40共刺激信号传导区域的序列的非限制性实例在US 2012/20148552A1中公开。

[0246] 在一个特定实施方案中,本发明的CAR包含4-1BB共刺激信号传导区域,其优选包含SEQ ID NO:21的序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组

成。

[0247] 信号肽

[0248] 除了抗原靶向结构域、铰链结构域、跨膜结构域和信号传导胞内结构域之外,本发明的CAR可以进一步包含连接至CAR的N末端的信号肽序列。信号肽序列存在于许多分泌蛋白和膜蛋白的N末端,并且通常具有15至30个氨基酸的长度。由于上述许多蛋白质分子具有信号肽序列,因此这些信号肽可用作本发明的CAR的信号肽。

[0249] 在一个实施方案中,包含抗原结合结构域的序列还包含信号肽。在其中抗原结合结构域包含抗原结合片段优选scFv的实施方案中,信号肽可以位于抗原结合片段或scFv的氨基末端。在一些实施方案中,当重链可变区是N-末端时,信号肽可以位于重链可变区的氨基末端。在一些实施方案中,当轻链可变区是N-末端时,前导序列可以位于轻链可变区的氨基末端。前导序列可以包括任何合适的信号序列。在一个实施方案中,本发明的CAR(优选抗体或抗原结合片段,甚至更优选scFv)包含选自CD8a、小鼠Igκ信号肽、人IgG4信号肽、IL2信号肽、人IgG2信号肽和Gaussia luc信号肽的信号肽。在一个实施方案中,本发明的CAR优选地scFv包含选自SEQ ID NO:17、24、75、76、77和78的信号肽。

[0250] 在一个特定实施方案中,本发明的CAR包含CD8a信号肽,其优选包含SEQ ID NO:17的序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0251] 可裂解的接头

[0252] 在一个特定实施方案中,根据本发明的CAR还包含可裂解的接头。可裂解的接头可以是肽、多肽或多肽的一部分,其在蛋白质或多肽产生后,特别是在根据本发明的CAR的翻译后被裂解。

[0253] 特别地,可裂解的接头是可自裂解的、自身裂解的、自裂解肽或接头,这些术语在本文可互换使用。

[0254] 在一个实施方案中,可裂解的接头包含2A肽。“2A”或“2A-样”序列是可能导致肽键跳过的大家族肽的一部分。特别地,最近发现2A介导的“自裂解”的机制是核糖体跳过2A肽的C末端的甘氨酸-脯氨酸肽键的形成。2A-肽介导的裂解在翻译后开始。成功的跳过和重新翻译导致两个“裂解”的蛋白质:2A上游的蛋白质与完整(除了C末端脯氨酸以外)的2A肽附接,和2A下游的蛋白质在N末端与一个脯氨酸附接。成功跳过但核糖体脱落和不连续的翻译仅导致2A上游的蛋白质。在小核糖核酸病毒、昆虫病毒和C型轮状病毒中已鉴定出几种2A肽。

[0255] 根据本发明的可裂解的接头的实例包括但不限于猪捷申病毒-12A(P2A),FMDV 2A(F2A);马甲鼻炎病毒(ERAV) 2A(E2A);和Thosea asigna病毒2A(T2A),质型多角体病毒2A(BmCPV2A)和软化病病毒2A(BmIFV2A)或其组合,例如诸如在Kim等人,(2011) PLoS ONE 6(4):e18556和Liu等人,(2017) Sci Rep.2017;7:2193中所描述的那些。

[0256] 优选地,可裂解的接头是P2A,其包含SEQ ID NO:28所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0257] 在一个实施方案中,可裂解的接头的N-末端可操作地连接至CAR胞内结构域的C-末端和/或可裂解的接头的C-末端可操作地连接至报告分子的N-末端。

[0258] 报告分子

[0259] 出于安全原因,为了追踪目的或为了消除不需要的修饰的CAR表达细胞,根据本发

明的CAR构建体可以进一步包含选择标记物或报告分子。特别地,可以用自裂解接头工程改造CAR细胞以共表达CAR和报告分子,以提供例如通过抗体选择或消除CAR细胞的可能性。

[0260] 在一个特定实施方案中,报告分子的N末端通过可裂解的接头(如上文所述的2A接头)连接至抗HLA-G CAR,以允许报告分子的释放。然后可以使用报告分子来确认CAR构建体向感兴趣的细胞的成功递送或表达。

[0261] 特别地,报告分子选自c-myc标签,CD20,CD52(Campath),截短的EGFR(EGFRt),截短的CD19(CD19t),或其任何部分或组合,或可以在细胞中表达和/或检测的任何其他标记物分子。

[0262] 在一个优选的实施方案中,报告分子是CD19报告分子,优选截短的人CD19(hCD19t)报告分子,其中已经去除了来自位置314-556的氨基酸(即,去除313个氨基酸)。在一个特定实施方案中,截短的人CD19是由GeneArt合成的,其含有登录号为NP_001171569.1的人CD19的细胞外和跨膜部分(氨基酸1-313)。

[0263] 优选地,报告分子是截短的人CD19报告分子,其包含SEQ ID NO:28所示的序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0264] 本发明的特定CAR

[0265] 在一个特定实施方案中,本发明的CAR包含信号肽,优选CD8a信号肽;特异于一种或几种HLA-G同种型的抗原结合结构域,特别是作为scFv,优选如上文所述;任选地铰链,优选包含以下或由以下组成:(i)人IgG4铰链结构域,(ii)人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域,或(iii)突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域或(iv)CD28铰链或(v)CD8a铰链;跨膜结构域,优选CD28跨膜结构域;共刺激信号传导区域,优选选自CD28、4-1BB和OX40共刺激信号传导区域,更优选4-1BB共刺激信号传导区域;和CD3 ζ 信号传导结构域,和任选地可裂解的接头,优选2A接头,以及报告分子,优选hCD19t报告分子。

[0266] 在一个实施方案中,CAR构建体是双特异性CAR构建体,其包含(i)包含分别包含SEQ ID NO:11、12和13的序列的CDR 1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的结构域(ii)包含分别包含SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的结构域;(iii)包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7的序列的CDR 1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的结构域,以及(iv)包含分别包含SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的结构域,任选地其中每个CDR可以任选地包含1、2、3或4个氨基酸置换、缺失或插入。

[0267] 更具体地,本发明的CAR可以包含SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37、83或85的多肽序列或与SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37、83或85的序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性并且具有相同的功能的序列或由其组成。

[0268] CAR变化

[0269] 包括在本发明的范围内的是本文所述的本发明的CAR的功能部分。当涉及CAR使用时,术语“功能部分”是指本发明CAR的任何部分或片段,该部分或片段保留了其所属的CAR(亲本CAR)的生物学活性。功能部分包括例如将识别抗原或靶细胞或检测、治疗或预防疾病的能力保留至与亲本CAR相似的程度、相同的程度或更高的程度的CAR的那些部分。关于亲本CAR,功能部分可以包含例如亲本CAR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0270] 功能部分可在该部分的氨基或羧基末端或两个末端包含另外的氨基酸,该另外的

氨基酸不存在于亲本CAR的氨基酸序列中。期望地,所述另外的氨基酸不干扰生物学功能,例如识别靶细胞,检测癌症,治疗或预防癌症等。更期望地,与亲本CAR的生物学活性相比,所述另外的氨基酸增强生物学活性。

[0271] 包括在本发明的范围内的是本文所述的本发明的CAR或抗体的功能变体或生物等同物。功能变体可以例如包含具有至少一个保守氨基酸置换的亲本多肽的氨基酸序列。可替代地或另外地,功能变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸置换的亲本多肽的氨基酸序列。在这种情况下,优选非保守氨基酸置换不干扰或抑制功能变体的生物学活性。非保守氨基酸置换可增强功能变体的生物学活性,使得与亲本多肽相比,功能变体的生物学活性增加。

[0272] 这样的生物学变体(包括其功能部分)可以包含合成氨基酸代替一个或多个天然存在的氨基酸。

[0273] 这样的生物学变体(包括其功能部分)可以被糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、经由例如二硫键环化或转化成酸加成盐和/或任选地二聚化或聚合或缀合。

[0274] 这样的生物学变体(包括其功能部分)可以通过本领域已知的方法获得。可以通过任何合适的制备多肽或蛋白质的方法来制备多肽。从头合成多肽和蛋白质的合适方法描述于参考文献中,例如Chan等人,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2000;Peptide and Protein Drug Analysis,ed.Reid,R.,Marcel Dekker,Inc.,2000;Epitope Mapping,ed.Westwood等人,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2001和美国专利号5,449,752。此外,可以使用标准重组方法使用本文所述的核酸重组产生多肽和蛋白质。参见,例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ed.,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.2001;和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates和John Wiley&Sons,NY,1994。

[0275] 用于CAR表达的核酸构建体和载体

[0276] 本发明还涉及编码如上文所述的抗体的核酸或编码根据本发明的CAR的核酸。可以将这样的核酸转导到细胞特别是免疫细胞中,以产生CAR表达细胞。特别地,核酸构建体包含编码如上文所述的外部结构域、细胞内结构域、跨膜、任选地铰链结构域和任选地可裂解的接头、报告分子和/或信号肽的序列。

[0277] 在一个实施方案中,核酸构建体从N至C端顺序地包含:任选地肽信号序列,抗HLA-G抗体或其片段,优选抗HLA-G scFv,间隔结构域,跨膜结构域,至少一个细胞内结构域以及任选地可裂解的接头和报告分子。

[0278] 在另一个实施方案中,核酸构建体进一步包含标签,优选地Flag标签。例如,Flag标签包含SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:79或由其组成。

[0279] 在一些实施方案中,核酸构建体包含:

[0280] (i) 编码如上文所述的抗HLA-G scFv的核酸序列;

[0281] (ii) 任选地编码铰链的核酸序列,所述铰链优选地选自:(i) CD28铰链,(ii) CD8 α 铰链,(iii) 人IgG4铰链结构域,(iv) 人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域或(v) 突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域

[0282] (iii) 编码跨膜结构域优选CD28跨膜结构域的核酸序列;

- [0283] (iii) 编码胞内结构域优选地4-1BB结构域和/或CD3 ζ 结构域的核酸序列;
- [0284] (iv) 任选地可裂解的接头,优选P2A可裂解的接头;
- [0285] (v) 任选地报告分子,优选hCD19t报告分子;和/或
- [0286] (vi) 任选地信号肽,优选选自CD8 α 、小鼠Ig κ 信号肽、人IgG4信号肽和IL2信号肽。
- [0287] 在一些实施方案中,核酸构建体包含:
- [0288] (i) 分别编码SEQ ID NO:5、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR 3的核酸序列,例如分别为SEQ ID NO:42、43和44;和
- [0289] (ii) 分别编码SEQ ID NO:8、9和10的LCDR1、LCDR2和LCDR3的核酸序列,例如分别为SEQ ID NO:45、46和47。
- [0290] 可替代地,核酸构建体包含:
- [0291] (i) 分别编码SEQ ID NO:11、12和13的HCDR1、HCDR2和HCDR3的核酸序列,例如分别为SEQ ID NO:48、49和50,和
- [0292] (ii) 分别编码SEQ ID NO:14、15和16的LCDR1、LCDR2和LCDR3的核酸序列,例如分别为SEQ ID NO:51、52和53。
- [0293] 在一个特定实施方案中,核酸构建体包含以下或基本上由以下组成:
- [0294] (i) 编码SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列的核酸序列,例如SEQ ID NO:38;
- [0295] (ii) 编码SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列的核酸序列,例如SEQ ID NO:39;
- [0296] (iii) 任选地编码(a)SEQ ID NO:18、(b)SEQ ID NO:19、(c)SEQ ID NO:25、(d)SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:27或(e)SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的核酸序列,或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列,例如分别为(a)SEQ ID NO:55、(b)SEQ ID NO:56、(c)SEQ ID NO:62、(d)SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:64或(e)SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64;
- [0297] (iv) 编码跨膜结构域,优选CD28跨膜结构域,甚至更优选SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:80的核酸序列;
- [0298] (v) 编码胞内结构域,优选4-1BB结构域,例如SEQ ID NO:58或81,和/或CD3 ζ 胞内结构域,例如SEQ ID NO:59或82,优选4-1BB结构域和CD3 ζ 胞内结构域的核酸序列;
- [0299] (vi) 任选地编码可裂解的接头,优选P2A可裂解的接头,甚至更优选地编码SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列的核酸序列,例如SEQ ID NO:65;
- [0300] (vii) 任选地,编码报告分子,优选hCD19t报告分子,甚至更优选地编码SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列的核酸序列,例如SEQ ID NO:66;
- [0301] (viii) 任选地,编码信号肽,优选CD8 α 号肽,甚至更优选SEQ ID NO:54或61的核酸序列。
- [0302] 在又一个实施方案中,核酸构建体还包含编码标签,优选Flag标签的核酸序列,例如SEQ ID NO:23或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列。
- [0303] 在另一个特定实施方案中,核酸构建体包含以下或基本上由以下组成:

[0304] (i) 编码SEQ ID NO:3的核酸序列或与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列;例如,SEQ ID NO:40;和/或

[0305] (ii) 编码SEQ ID NO:4的核酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列;例如,SEQ ID NO:41;

[0306] (iii) 任选地编码(a)SEQ ID NO:18、(b)SEQ ID NO:19、(c)SEQ ID NO:25、(d)SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:27或(e)SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的核酸序列,或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列,例如分别为(a)SEQ ID NO:55、(b)SEQ ID NO:56、(c)SEQ ID NO:62、(d)SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:64或(e)SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64;

[0307] (iv) 编码跨膜结构域,优选CD28跨膜结构域,甚至更优选SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:80的核酸序列;

[0308] (v) 编码胞内结构域,优选4-1BB结构域,例如SEQ ID NO:58或81,和/或CD3 ζ 胞内结构域,例如SEQ ID NO:59或82,优选4-1BB结构域和CD3 ζ 胞内结构域的核酸序列;

[0309] (vi) 任选地编码可裂解的接头,优选P2A可裂解的接头,甚至更优选地编码SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列的核酸序列,例如SEQ ID NO:65;

[0310] (vii) 任选地,编码报告分子,优选hCD19t报告分子,甚至更优选地编码SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列的核酸序列,例如SEQ ID NO:66;

[0311] (viii) 任选地,编码信号肽,优选CD8 α 号肽,甚至更优选SEQ ID NO:54或61的核酸序列。

[0312] 在又一个实施方案中,核酸构建体还包含编码标签,优选Flag标签的核酸序列,例如SEQ ID NO:23或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列。

[0313] 在另一个特定实施方案中,核酸构建体从N至C端顺序地包含以下或由以下组成:

[0314] (i) 任选地信号肽,优选CD8 α 信号肽,甚至更优选SEQ ID NO:54或61,

[0315] (ii) 编码SEQ ID NO:30的核酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列;例如SEQ ID NO:67;或编码SEQ ID NO:31的核酸序列或与SEQ ID NO:31具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列;例如SEQ ID NO:68;

[0316] (iii) 任选地编码(a)SEQ ID NO:18、(b)SEQ ID NO:19、(c)SEQ ID NO:25、(d)SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:27或(e)SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的核酸序列,或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列,例如分别为(a)SEQ ID NO:55、(b)SEQ ID NO:56、(c)SEQ ID NO:62、(d)SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:64或(e)SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64;

[0317] (iv) 编码跨膜结构域,优选CD28跨膜结构域,甚至更优选SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:80的核酸序列;

[0318] (v) 编编码胞内结构域,优选4-1BB结构域,例如SEQ ID NO:58或81,和/或CD3 ζ 胞内结构域,例如SEQ ID NO:59或82,优选4-1BB结构域和CD3 ζ 胞内结构域的核酸序列;

[0319] (vi) 任选地编码可裂解的接头,优选P2A可裂解的接头,甚至更优选地编码SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列的核酸序列,例

如SEQ ID NO:65;

[0320] (vii) 任选地,编码报告分子,优选hCD19t报告分子,甚至更优选地编码SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列的核酸序列,例如SEQ ID NO:66。

[0321] 在一个特定实施方案中,本发明提供了编码本发明的特定CAR的核酸序列,优选地,所述CAR描述于SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37、83或85所示的序列中,更优选这样的核酸序列或构建体包含SEQ ID NO:69、70、71、72、73、74、84或86或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0322] 编码嵌合受体的开放阅读框的序列可以从基因组DNA来源、cDNA来源获得,通过PCR从cDNA来源或以其他方式产生。在其他方面,它可以化学合成或其组合。取决于基因组DNA的大小和内含子的数量,可能期望使用cDNA或其组合,因为发现内含子使mRNA稳定或提供免疫细胞,特别是T细胞特异性表达(Barthel和Goldfeld,2003)。此外,可能进一步有利的是使用内源或外源非编码区来稳定mRNA。

[0323] 为了表达本发明的嵌合抗原受体,编码嵌合受体N末端组分的核酸序列的天然存在的或内源的转录起始区可用于在靶宿主细胞中产生嵌合受体。可替代地,可以使用允许组成型或诱导型表达的外源转录起始区,其中可以根据靶宿主、所需表达水平、靶宿主的性质等来控制表达。

[0324] 同样,将嵌合受体引导至表面膜的信号序列可以是嵌合受体的N-末端组分的内源性信号序列。任选地,在一些情况下,可能期望将该序列交换为不同的信号序列。但是,所选择的信号序列应与将表达CAR的免疫细胞的分泌途径相容,使得嵌合受体存在于细胞表面上。

[0325] 根据本发明,将核酸构建体转化或引入细胞中,并被转录和翻译以产生产物(即嵌合受体)。因此,核酸构建体可以进一步包含至少一个用于指导CAR转录的启动子。

[0326] 在一个实施方案中,启动子与编码本发明的嵌合受体的核酸序列可操作地连接,即,它们被定位以便促进信使RNA从编码嵌合受体的DNA转录。启动子可以是基因组来源的或合成产生的。用于免疫细胞特别是T细胞的多种启动子是本领域众所周知的(例如,Marodon等人,(2003)公开的CD4启动子)。启动子可以是组成型或可诱导的,其中诱导与例如特定的细胞类型或特定的成熟水平或药物(例如四环素或阿霉素)有关。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白(metallothionine)启动子,糖皮质激素启动子,孕酮启动子和四环素启动子。可替代地,许多众所周知的病毒启动子也是合适的。感兴趣的启动子包括 β -肌动蛋白启动子,SV40早期和晚期启动子,免疫球蛋白启动子,人巨细胞病毒启动子,逆转录病毒启动子以及Friend脾病灶形成病毒启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV),人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子,MoMuLV启动子,禽白血病病毒启动子,巨细胞病毒立即早期启动子,劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子,例如但不限于肌动蛋白启动子,肌球蛋白启动子,血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。所述启动子可以与或可以不与增强子缔合,其中所述增强子可以与特定启动子天然缔合或与不同的启动子缔合。

[0327] 类似地,可以通过编码嵌合受体的C-末端组分的核酸序列的天然存在或内源的转录终止区来提供终止区。可替代地,终止区可以衍生自不同的来源。在大多数情况下,通常不认为终止区的来源对重组蛋白的表达至关重要,并且可以使用广泛多样的终止区而不会

不利地影响表达。如本领域技术人员将理解的,在一些情况下,CAR中抗原结合结构域的末端的一些氨基酸可被缺失,通常例如不超过10个,更通常不超过5个残基。此外,可能期望在边界处引入少量氨基酸,通常不超过10个,更通常不超过5个残基。氨基酸的缺失或插入可以是由于构建的需要,提供了方便的限制性位点、易于操作、表达水平提高等。另外,用不同的氨基酸置换一个或多个氨基酸可以出于相似的原因而发生,通常在任何一个结构域中不置换超过约五个氨基酸。

[0328] 在另一个实施方案中,核酸构建体进一步包含启动子、正确的翻译起始序列例如核糖体结合位点和起始密码子、终止密码子和转录终止序列。

[0329] 根据本发明的核酸构建体还可包含其他调节区,例如增强子、沉默子和边界元件/绝缘子,以指导给定基因的转录水平。

[0330] 可以以常规方式制备编码根据本发明的嵌合受体的核酸构建体。因为在大多数情况下可以使用天然序列,所以可以适当地分离和操纵天然基因,以便允许各种组分的适当结合。因此,可以使用合适的引物通过采用聚合酶链式反应(PCR)分离编码嵌合受体的N-末端和C-末端蛋白质的核酸序列,所述适当的引物导致基因的不想要的部分的缺失。可替代地,可以使用克隆基因的限制性消化来产生嵌合构建体。在任一种情况下,可以选择序列以提供平末端的或具有互补重叠部分的限制性位点。

[0331] 可以在体外进行用于制备嵌合构建体的各种操作,并且在特定实施方案中,使用标准转化或转染方法将嵌合构建体引入载体中以用于在合适的宿主中克隆和表达。因此,在每次操作后,克隆来自DNA序列的连接所得的构建体,分离载体,并筛选序列以确保该序列编码所需的嵌合受体。可以通过限制性分析、测序等来筛选序列。

[0332] 可以使用表达载体制备CAR。本公开内容的方面涉及编码HLA-G CAR的核酸序列和包含编码如文上所述的CAR的核酸序列的载体。

[0333] 例如,可以将根据本发明的核酸构建体克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、病毒和黏粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。根据核酸构建体和宿主细胞,根据本发明的载体可以包含:启动子,终止子,复制起点,选择标记物,多个克隆位点,包装位点等。在一些其他实施方案中,载体在编码CAR的序列的上游包含Kozak共有序列或可替代地基本上由其组成或进一步由其组成。在一些实施方案中,载体包含赋予抗生素抗性的多核苷酸。

[0334] 特别地,可以将本发明的载体以病毒载体的形式提供给细胞。已经开发了许多用于将基因转移到哺乳动物细胞中的基于病毒的系统。病毒载体技术是本领域众所周知的,并且例如在Sambrook等人,((2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)以及其他病毒学和分子生物学手册中描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。优选地,载体是整合型慢病毒载体。慢病毒载体比衍生自肿瘤逆转录病毒(oncoretroviruses)的载体具有更多的优势,因为它们可以转导非增殖细胞并呈现低免疫原性。一般而言,合适的载体包含在至少一种生物中有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点以及一种或多种选择标记物,例如在WO 01/96584;WO 01/29058;和US 6,326,193中所描述的。

[0335] 特别地,为了评估CAR的表达,待引入细胞中的表达载体还可以包含选择标记基因

或报告基因或两者,以促进从应通过病毒载体转染或感染的细胞群鉴定和选择表达细胞,在其他方面,选择标记物可以被携带在分开的DNA片段上并用于共转染程序。选择标记物和报告基因可以侧接合适的调节序列,以实现在宿主细胞中的表达。有用的选择标记物包括例如抗生素抗性基因等。

[0336] 一方面,术语“载体”是指重组载体,其保留感染和转导非分裂和/或缓慢分裂细胞并整合到靶细胞基因组中的能力。在几个方面,载体衍生自或基于野生型病毒。在其他方面,载体衍生自或基于野生型逆转录病毒。特别地,逆转录病毒可以选自白血病病毒,例如莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)或长臂猿白血病病毒(GALV)。外源增强子和启动子可以是人巨细胞病毒(HCMV)立即早期(IE)增强子和启动子、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MMSV)的增强子和启动子(U3区域)、劳斯肉瘤病毒(RSV)的U3区域、脾病灶形成病毒(SFFV)的U3区域或连接至天然莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)启动子的HCMV IE增强子。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已成为将基因插入哺乳动物例如人细胞中的最广泛使用的方法。病毒载体还可以衍生自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I(HSV)、Epstein Barr病毒(EBV)、乳头瘤病毒、腺病毒和腺相关病毒等。参见,例如,美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0337] 优选地,根据本发明的载体是慢病毒载体。特别地,载体衍生自灵长类和非灵长类慢病毒。灵长类慢病毒的实例包括人免疫缺陷病毒(HIV)、人获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的病原体 and 猴免疫缺陷病毒(SIV)。非灵长类慢病毒组包括原型“慢病毒”visna/maedi病毒(VMV),以及相关的山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV),马传染性贫血病毒(EIAV)和最近描述的猫免疫缺陷病毒(FIV)和牛免疫缺陷病毒(BIV)。现有技术的重组慢病毒载体在本领域中是已知的,例如,参见美国专利号6,924,123;7,056,699;7,07,993;7,419,829和7,442,551,其通过引用并入本文。

[0338] 用于本公开内容的商业逆转录病毒载体包括但不限于pFB-neo载体(**STRATAGENE®**)、Invitrogen的pLenti系列版本4、6和6.2“ViraPower”系统。由Lentigen Corp.制造;pHIV-7-GFP,由City of Hope Research Institute实验室生成和使用;Clontech生产的“Lenti-X”慢病毒载体pLVX;pLK0.1-puro,由Sigma-Aldrich生产;pLemiR,由Open Biosystems生产;以及pLV,由CharitéMedical School, Institute of Virology (CBF), Berlin, Germany实验室生成和使用。

[0339] 将明显的是根据本公开内容的病毒载体不需要局限于特定病毒的组分。病毒载体可以包含衍生自两种或更多种不同病毒的组分,并且还可以包含合成组分。可以操纵载体组分以获得所需的特性,例如靶细胞特异性。

[0340] US 6,924,123公开某些逆转录病毒序列有助于整合到靶细胞基因组中。该专利教导每个逆转录病毒基因组包含被称为gag、pol和env的基因,其编码病毒体蛋白和酶。这些基因在两端由被称为长末端重复序列(LTR)的区域侧接。LTR负责前病毒整合和转录。它们还用作增强子-启动子序列。因此,根据本发明的载体可以包含一个或多个整合特征。

[0341] 在一些实施方案中,未由载体基因组编码的颗粒的组分由宿主细胞中表达的另外的核酸序列(“包装系统”,其通常包括gag/pol和env基因中的一个或两个)反式提供,例如使用辅助病毒策略。可以通过瞬时转染将产生病毒载体颗粒所需的一组序列引入宿主细胞,或者可以将它们整合到宿主细胞基因组中,或者可以以混合方式提供它们,例如辅助序列。所涉及的技术是本领域技术人员已知的。例如,逆转录病毒构建体是包含至少一个衍生

自无复制能力的逆转录病毒基因组的逆转录病毒辅助DNA序列的包装质粒,其反式编码包装无复制能力的逆转录病毒载体所需的所有病毒体蛋白质,并且用于产生能够以高滴度包装无复制能力的逆转录病毒载体的病毒体蛋白质,而不产生具有复制能力的辅助病毒。

[0342] 在包装过程中,将表达根据本发明的CAR的包装质粒和逆转录病毒载体瞬时共转染到能够产生病毒的第一哺乳动物细胞群中,例如人胚胎肾细胞,例如293细胞(ATCC No.CRL1573,ATCC,Rockville,Md.),以产生高滴度的含重组逆转录病毒的上清液。在本发明的另一种方法中,该瞬时转染的第一细胞群随后与哺乳动物靶细胞(例如人淋巴细胞)共培养,以用外源基因以高效率转导靶细胞。在本发明的另一种方法中,将来自上述瞬时转染的第一细胞群的上清液与哺乳动物靶细胞(例如人淋巴细胞或造血干细胞)一起孵育,以用外源基因以高效率转导靶细胞。

[0343] 使用本领域已知的技术将根据本发明的核酸构建体插入载体并包装在逆转录病毒或慢病毒颗粒中。然后可以将重组病毒分离并在体内或离体递送至受试者的细胞。在一个特定方面,包装质粒在能够产生病毒的第一哺乳动物细胞群(例如人胚胎肾细胞,例如293细胞)中稳定表达。通过与选择标记物共转染或用假型病毒感染将逆转录病毒或慢病毒载体引入细胞。在两种情况下,载体都整合。可替代地,可以将载体引入游离维持的质粒中。

[0344] 抗HLA-G CAR表达细胞

[0345] 本发明涉及表达如本文所述的CAR的细胞。细胞可以是任何种类,包括能够表达CAR的免疫细胞或具有编码CAR的表达载体的细胞,例如细菌细胞。

[0346] 在表达编码本发明的CAR的异源核酸序列的上下文中,“宿主细胞”是指能够复制载体和/或表达由载体编码的异源基因的细胞。术语“细胞”还包括其后代,其是任何和所有后代。应当理解,由于有意或无意的突变,所有后代可能不是相同的。宿主细胞可以被根据本发明的核酸构建体或载体转染。转化的细胞包括原代受试者细胞及其后代。如本文所用,术语“工程改造的”和“重组的”细胞或宿主细胞意指其中已引入外源核酸序列诸如例如载体更具体地说是CAR的细胞。因此,重组细胞可与不包含重组引入的核酸的天然存在的细胞区分开。

[0347] 用编码CAR的核酸构建体转导细胞后,细胞将识别CAR指定的HLA-G同种型。因此,本发明还涉及表达根据本发明的CAR的细胞。特别地,根据本发明的抗HLA-G CAR表达细胞是能够表达根据本发明的CAR的免疫细胞。在某些实施方案中,免疫细胞被转染以包含至少本发明的CAR。

[0348] 细胞可以包含特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5同种型的CAR。可替代地,细胞可以包含特异性结合无 β 2M的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6同种型和/或HLA-G1/无 β 2M和/或HLA-G5/无 β 2M同种型的CAR。

[0349] 在一个实施方案中,细胞表达至少两种不同的CAR。例如,细胞可以包含特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5的CAR,以及另一种与不同的抗原特异性结合的CAR。细胞可以可替代地包含特异性结合无 β 2M的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或HLA-G1/无 β 2M和/或HLA-G5/无 β 2M同种型的CAR,以及另一种与不同抗原特异性结合的CAR。特别地,细胞可以包含特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5的CAR,以及特异性结合无 β 2M的HLA-G同种型,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或HLA-G1/无 β 2M和/或HLA-G5/无 β 2M同种型的CAR。

[0350] 优选地,细胞包含含有如上文所述的衍生自LFTT-1抗体的抗原结合片段的CAR和含有如上文所述的衍生自15E7抗体的抗原结合片段的CAR。

[0351] 优选地,这样的细胞因此包含第一CAR,其包含(i)包含分别包含SEQ ID NO:11、12和13的序列的CDR 1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的一条重链,和(ii)包含分别包含SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的一条轻链,以及第二CAR,其包含(i)包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7的序列的CDR 1、2和3(HCDR1、HCDR2、HCDR3)的一条重链,以及(ii)包含分别包含SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3(LCDR1、LCDR2、LCDR3)的一条轻链,任选地其中每个CDR可以任选地包含1、2、3或4个氨基酸置换、缺失或插入。甚至更优选地,这样的细胞因此包含第一CAR,其包含SEQ ID NO:32、33、34或85所示序列或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成,以及第二CAR,其包含SEQ ID NO:35、36、37或83或与其具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的序列或由其组成。

[0352] 可替代地,细胞可以表达包含如上文所述的双特异性抗原结合结构域的双特异性CAR,所述双特异性抗原结合结构域包含识别HLA-G/无 β 2M同种型优选HLA-G2和HLA-G6和/或HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型的结构域,以及识别与 β 2M结构域缔合的HLA-G同种型优选HLA-G1和HLA-G5的第二结构域。

[0353] 任选地,根据本发明的表达CAR抗HLA-G的细胞进一步表达CAR,所述CAR靶向与疾病(优选地例如癌症或病毒感染)相关的抗原,优选地在癌症疗法或病毒疗法中被靶向的抗原。应该理解,这种抗原不是HLA-G。

[0354] 根据本发明的细胞可以是原核或真核细胞。优选地,细胞是真核细胞,例如哺乳动物细胞,并且通常是人、猫或犬细胞,更通常是人细胞,优选原代人细胞。

[0355] 优选地,细胞是免疫细胞。所述细胞可以选自T细胞,包括CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞,B细胞,NK细胞,NKT细胞,单核细胞和树突状细胞,优选所述细胞是T细胞、B细胞和NK细胞。

[0356] 细胞可以是自体细胞、同基因细胞、同种异体细胞,并且甚至在某些情况下是异种细胞。例如,可用于本发明的合适的免疫细胞包括自体T淋巴细胞,同种异体T细胞,异种T细胞,前述任何一种的祖细胞,转化的肿瘤或异种免疫效应细胞,肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),细胞毒性淋巴细胞或活化时能够杀死靶细胞的其他细胞。

[0357] 免疫细胞可以分离自人或非人受试者,或者可以衍生自干细胞,例如胚胎干细胞,多潜能干细胞,多能干细胞,诱导多能干细胞(iPSC),成体干细胞或其他重编程的细胞。可以从样品,例如生物样品(例如获自或衍生自受试者的样品)分离用于引入本文所述的核酸构建体的细胞。在一些实施方案中,从其分离细胞的受试者是患有疾病或病况或需要细胞疗法或将其施用细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,受试者是需要特定治疗干预的人,例如针对其分离、加工和/或工程改造的细胞的过继细胞疗法。在一些实施方案中,细胞衍生自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,例如先天或适应性免疫系统的细胞,例如髓样或淋巴样细胞,包括淋巴细胞,通常T细胞和/或NK细胞。

[0358] 在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个子集,例如完整T细胞群、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞及其亚群,例如由功能、活化状态、成熟度、分化、扩增潜能、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体的类型、在特定器官或区室中的存在、标记物或细胞因子分泌概况和/或分化程度限定的那些。

[0359] 在某些实施方案中,免疫细胞是T细胞,例如动物T细胞,哺乳动物T细胞,猫T细胞,犬T细胞或人T细胞。T细胞和/或CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的亚型和亚群包括幼稚T (TN) 细胞,效应T细胞 (TEFF),记忆T细胞及其亚型,例如干细胞记忆T (TSCM),中央记忆T (TCM),效应记忆T (TEM) 或终末分化的效应记忆T细胞,肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL),未成熟T细胞,成熟T细胞,辅助T细胞,细胞毒性T细胞,粘膜相关性不变T (MAIT) 细胞,天然存在的和适应性调节性T (Treg) 细胞,辅助T细胞,例如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、卵泡辅助T细胞、 α/β T细胞和 δ/γ T细胞。可商购获得的T细胞系的非限制性实例包括细胞系 BCL2 (AAA) Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2902[™])、BCL2 (S70A) Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2900[™])、BCL2 (S87A) Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2901[™])、BCL2 Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2899[™])、Neo Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2898[™])、TALL-104细胞毒性人T细胞系 (ATCC#CRL-11386)。其他实例包括但不限于成熟的T细胞系,例如诸如Deglis、EBT-8、HPB-MLp-W、HUT 78、HUT 102、Karpas 384、Ki 225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1和T34;和未成熟的T细胞系,例如ALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas 45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT 3、MOLT-4、MOLT 13、MOLT-16、MT-1、MT-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、RPMI-8402、ST-4、SUP-T1至T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1、-2、-3和-4、CCRF-HSB-2 (CCL-120.1)、J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153)、J45.01 (ATCC CRL-1990)、J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063)、RS4;11 (ATCC CRL-1873)、CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119);和皮肤T细胞淋巴瘤细胞系,例如HuT78 (ATCC CRM-TIB-161)、MJ[G11] (ATCC CRL-8294)、HuT102 (ATCC TIB-162)。此类可商购获得的细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (<http://www.atcc.org/>) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心 (<https://www.dsmz.de/>)。

[0360] 在一些实施方案中,细胞是自然杀伤 (NK) 细胞,自然杀伤T (NKT) 细胞,细胞因子诱导的杀伤 (CIK) 细胞,肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL),淋巴因子活化的杀伤 (LAK) 细胞等。NK细胞可以从可商购获得的来源分离或获得。商业性NK细胞系的非限制性实例包括细胞系NK-92 (**ATCC**[®] CRL-2407[™])、NK-92MI (**ATCC**[®] CRL-2408[™])。其他实例包括但不限于NK细胞系HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、NOI-90和YT。此类可商购获得的细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (<http://www.atcc.org/>) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心 (<https://www.dsmz.de/>)。

[0361] 在一个特定实施方案中,呈递根据本发明的CAR的宿主细胞选自细胞毒性T细胞 (也称为TC,细胞毒性T淋巴细胞,CTL,T杀伤细胞,裂解性T细胞,CD8⁺T细胞或杀伤性T细胞) 和NK细胞。

[0362] 在一些实施方案中,细胞是B细胞、单核细胞或粒细胞,例如,髓样细胞,巨噬细胞,嗜中性粒细胞,树突状细胞,肥大细胞,嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

[0363] 制备CAR表达细胞的方法

[0364] 将基因引入细胞并在细胞中表达基因的方法是本领域已知的。

[0365] 特别地,用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见,例如,Sambrook等人 (2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring

Harbor Laboratory, New York)。在表达载体的情况下,可以通过本领域的任何方法将载体容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,表达载体可以通过物理、化学或生物学手段转移到宿主细胞中,这将在下文中更详细地描述。

[0366] 在一些实施方案中,如本文所述的,所述方法包括从受试者分离细胞,制备、加工、培养和/或工程改造它们,并在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者。

[0367] 这里特别提供了产生抗HLA-G CAR表达细胞的方法,所述方法包括以下步骤,或可替代地基本上由以下步骤组成,或者进一步由以下步骤组成:(i)用编码如本文所述的CAR的核酸序列转导分离的细胞的群体;和(ii)选择步骤(i)的已被所述核酸序列成功转导的所述分离的细胞的亚群,从而产生抗HLA-G CAR表达细胞。一方面,分离的细胞选自T细胞和NK细胞。

[0368] 这里甚至更特别地提供了产生抗HLA-G CAR表达细胞的方法,所述方法包括以下步骤,或可替代地基本上由以下步骤组成,或者进一步由以下步骤组成:(i)获得免疫细胞群(例如血细胞)(ii)分离特定细胞群(例如T细胞和/或NK细胞)(iii)用编码本文所述的CAR的核酸序列转导分离的细胞的群体;和(ii)选择步骤(iii)的已被所述核酸序列成功转导的所述分离的细胞的亚群,从而产生抗HLA-G CAR表达细胞。这些不同的步骤将在下面更详细地描述。

[0369] 细胞采集

[0370] 在本文公开的细胞的扩增和遗传修饰之前,可以从受试者获得细胞(例如在涉及自体治疗的实施方案中),或从可商购获得的培养物中获得细胞。

[0371] 可以从样品包括组织、体液(例如血液、血浆、血清、脑脊髓液、滑液、尿液和汗液)以及直接从受试者采集的其他样品以及由一种或多种处理步骤(例如分离,离心,基因工程改造的(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)产生的样品中获取细胞。

[0372] 可从许多非限制性来源获得细胞,包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺组织、淋巴结组织、脐带血、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、肠道相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾脏、胰腺、乳腺、骨、前列腺、宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官,和/或由其衍生的细胞。在细胞治疗例如过继细胞疗法的情况下,样品包括来自自体 and 异体来源的样品。

[0373] 在一些实例中,例如通过单采血液分离术或白细胞分离术从受试者的循环血液中获得细胞。在某些方面,样品包含淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面包含除红细胞和血小板以外的细胞。

[0374] 在一些实施方案中,可以使用例如上文所述的本领域技术人员可获得和已知的任何数量的T细胞或NK细胞系。在一些实施方案中,细胞可以衍生自健康供体、诊断为患有癌症的患者、诊断为患有自身免疫或炎性病症的患者或诊断为患有感染的患者。在一些实施方案中,细胞可以是呈现不同表型特征的混合细胞群的一部分。

[0375] 细胞分离

[0376] 如本领域技术人员已知的,多种方法可容易地用于从受试者中分离免疫细胞,或可适用于本申请,例如使用Life Technologies **Dynabeads**[®] 系统;STEMcell Technologies EasySep[™], RoboSep[™], RosetteSep[™], SepMate[™];Miltenyi Biotec MACS[™]细胞分离试剂盒、细胞表面标记物表达以及其他可商购获得的细胞分开和分离试剂盒(例如,

来自Pierce的ISOCELL, Rockford, IL)。免疫细胞的特定亚群可以通过使用在这种试剂盒中可用的对独特的细胞表面标记物特异的珠子或其他结合剂来分离。例如, MACS™CD4+和CD8+ MicroBead可用于分离CD4+和CD8+T细胞。在临床试验中也已经证实了分离和扩增抗原特异性T细胞作为用于人疾病的治疗干预的策略 (Riddell等人, 1992; Walter等人, 1995; Heslop等人, 1996)。

[0377] 在一些实施方案中, 细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些实例中, 在一种或多种试剂的存在下洗涤、离心和/或孵育细胞, 例如以去除不需要的组分、富集所需组分、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些实例中, 基于一种或多种性质, 例如密度、粘附性质、大小、敏感性和/或对特定组分的抗性来分离细胞。

[0378] 在一些实施方案中, 洗涤从受试者收集的血细胞, 例如以去除血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中以用于随后的处理步骤。在一些实施方案中, 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤细胞。在一些实施方案中, 洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面, 洗涤步骤根据制造商的说明通过半自动化的“流通式”离心机 (例如, Cobe 2991细胞处理器, Baxter) 来完成。在一些方面, 根据制造商的说明, 通过切向流过滤 (TFF) 来完成洗涤步骤。在一些实施方案中, 将细胞在洗涤后重悬于多种生物相容性缓冲液中, 例如, 无Ca²⁺/Mg²⁺的PBS。在某些实施方案中, 去除血细胞样品的组分, 并将细胞直接重悬浮在培养基中。

[0379] 在一些实施方案中, 分离方法包括基于一种或多种特异性分子 (例如表面标记物, 例如表面蛋白、细胞内标记物或核酸) 在细胞中的表达或存在来分离不同细胞类型。在一些实施方案中, 可以使用基于此类标记物的任何已知的分离方法。在一些实施方案中, 分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如, 在一些方面, 分离包括基于一种或多种标记物 (通常是细胞表面标记物) 的细胞表达或表达水平分离细胞和细胞群, 例如通过与特异性结合这样的标记物的抗体或结合伴侣一起孵育, 然后通常是洗涤步骤和将结合抗体或结合伴侣的细胞与未结合抗体或结合伴侣的细胞分离。这样的分离步骤可以基于阳性选择 (其中与试剂结合的细胞被保留用于进一步使用), 和/或阴性选择 (其中未与抗体或结合伴侣结合的细胞被保留)。在一些实例中, 两个级分均被保留用于进一步使用。在一些方面, 在没有可用的特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下, 阴性选择可能特别有用, 使得基于非所需群体的细胞表达的标记物来最好地进行分离。

[0380] 在一些实施方案中, 进行多轮分离步骤, 其中将来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分进行另一分离步骤, 例如随后的阳性或阴性选择。在一些实例中, 单个分离步骤可以同时消耗表达多种标记物的细胞, 例如通过将细胞与多种抗体或结合伴侣一起孵育, 每种抗体或结合伴侣对靶向用于阴性选择的标记物具有特异性。同样, 可以通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合伴侣一起孵育来同时阳性选择多种细胞类型。

[0381] 例如, 在一些方面, T细胞的特定亚群, 例如阳性或表达高水平的一种或多种表面标记物 (例如, CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+和/或CD45RO+T细胞) 的细胞通过阳性或阴性选择技术分离。例如, 可使用缀合了CD3/CD28的磁珠 (例如 **DYNABEADS®** M-450 CD3/CD28 T Cell Expander) 扩增CD3+T细胞。

[0382] 在一些实施方案中, 通过阳性选择富集特定细胞群或通过阴性选择消耗特定细胞群来进行分离。在一些实施方案中, 通过将细胞分别与一种或多种抗体或其他结合剂孵育

来实现阳性或阴性选择,所述抗体或其他结合剂特异性结合在阳性或阴性选择的细胞上表达或以相对较高的水平表达(标记物+)的一种或多种表面标记物。

[0383] 在一些实施方案中,通过阴性选择在非T细胞(例如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标记物(例如CD14)将T细胞从样品分离。在一些方面,CD4或CD8选择步骤用于分离CD4⁺辅助和CD8⁺细胞毒性T细胞。可以通过对在一种或多种幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高的程度表达的标记物的阳性或阴性选择,将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类为亚群。

[0384] 在一些实施方案中,将CD8⁺细胞进一步富集或消耗幼稚、中央记忆、效应记忆和/或中央记忆干细胞,例如通过基于与各个亚群相关的表面抗原的阳性或阴性选择。在一些实施方案中,进行针对中央记忆T(TCM)细胞的富集以增加效力,例如以改善施用后的长期存活、扩增和/或植入,这在某些方面在此类亚群中是特别稳健的。参见Terakura等人,(2012)Blood.1:72-82;Wang等人,(2012)JImmunother.35(9):689-701。在一些实施方案中,将TCM富集的CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞组合进一步增强功效。

[0385] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻子集中。PBMC可例如使用抗CD8和抗CD62L抗体富集或消耗CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分。

[0386] 在一些实施方案中,中央记忆T(TCM)细胞的富集基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD127的阳性或高的表面表达;在某些方面,它基于针对表达或高表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在某些方面,通过消耗表达CD4、CD14、CD45RA的细胞和针对表达CD62L的细胞的阳性选择或富集进行针对TCM细胞富集的CD8⁺群体的分离。一方面,从基于CD4表达选择的细胞的阴性级分开始进行针对中央记忆T(TCM)细胞的富集,其经历基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择,和基于CD62L的阳性选择。在一些方面,这样的选择是同时进行的,而在其他方面,是以任一顺序依次执行的。在一些方面,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于产生CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分均被保留并用于方法的后续步骤中,任选地在一个或多个进一步的阳性和阴性选择步骤之后进行。

[0387] 在一些实施方案中,针对NK细胞的富集基于CD56和CD16的阳性或高表面表达和基于CD3的阴性表达和/或任选地基于Nkp46或Nkp30受体的存在。

[0388] 在一些方面,将待分离的细胞的样品或组合物与小的、可磁化的或磁响应的材料例如磁响应的颗粒或微粒例如顺磁珠(例如,Dynabeads或MACS珠)一起孵育。磁响应材料(例如颗粒)通常直接或间接附接到结合伴侣(例如抗体),其特异性结合存在于期望分离(例如期望阴性或阳性选择)的细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如表面标记物)。在一些实施方案中,磁性颗粒或珠子包含结合至特定结合成员(例如抗体或其他结合伴侣)的磁响应材料。存在在磁分离方法中使用的许多众所周知的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在Molday的美国专利号4,452,773和欧洲专利说明书EP452342B中描述的那些,其通过引用并入本文。胶体大小的颗粒,例如在Owen的美国专利号4,795,698和Liberti等人的美国专利号5,200,084中描述的那些,是其他实例。

[0389] 通常在这样的条件下进行孵育,在该条件下,附接至磁性颗粒或珠子的抗体或结合伴侣或分子(例如特异性结合这样的抗体或结合伴侣的第二抗体或其他试剂)特异性结合细胞表面分子(如果存在于样品内的细胞上)。

[0390] 在一些方面,将样品置于磁场中,并且将附着有磁响应性或可磁化颗粒的那些细胞吸引到磁体上并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁体吸引的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在相同选择步骤期间进行阳性选择和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并将其进一步处理或经受进一步的分离步骤。

[0391] 在某些实施方案中,将磁响应颗粒包被在一抗或其他结合伴侣、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,磁性颗粒通过对一种或多种标记物具有特异性的一抗的包被而附接至细胞。在某些实施方案中,用一抗或结合伴侣标记细胞而不是珠子,然后添加细胞类型特异性的二抗或其他结合伴侣(例如,链霉亲和素)-包被的磁性颗粒。在某些实施方案中,链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化的一抗或二抗结合使用。

[0392] 在一些实施方案中,使磁响应颗粒附接至细胞,所述细胞随后将被孵育、培养和/或工程改造;在一些方面,使颗粒附接至细胞用于施用至患者。在一些实施方案中,将可磁化的或磁响应的颗粒从细胞中去除。从细胞去除可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性未标记的抗体、可磁化颗粒或与可裂解的接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0393] 在某些实施方案中,使用执行方法的分离、细胞制备、分开、加工、孵育、培养和/或配制步骤中的一个或多个的系统、装置或设备来进行分离或分开。在一些方面,将系统用于在封闭或无菌环境中执行这些步骤中的每一个,例如,以最小化错误、用户处理和/或污染。在一个实例中,该系统是如国际专利申请公开号W02009/072003或US20110003380中所述的系统。

[0394] 在一些实施方案中,通过流式细胞术收集并富集(或消耗)本文所述的细胞群,其中针对多种细胞表面标记物染色的细胞在流体流中进行。在一些实施方案中,通过制备规模(FACS)分选收集并富集(或消耗)本文所述的细胞群。在某些实施方案中,通过与基于FACS的检测系统组合使用微机电系统(MEMS)芯片来收集和富集(或消耗)本文所述的细胞群(参见,例如,W0 2010/033140,Cho等人,(2010)Lab Chip 10,1567-1573;和Godin等人,(2008)J Biophoton.1(5):355-376)。在两种情况下,都可以用多种标记物标记细胞,从而允许以高纯度分离良好定义的T细胞子集。在一些实施方案中,抗体或结合伴侣用一种或多种可检测的标记物标记,以促进用于阳性和/或阴性选择的分离。例如,分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。在一些实例中,基于对一种或多种细胞表面标记物具有特异性的抗体或其他结合伴侣的结合的细胞分离在流体流中进行,例如通过荧光活化细胞分选(FACS),包括制备规模(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如与流式细胞术检测系统结合使用。此类方法允许同时进行基于多种标记物的阳性和阴性选择。

[0395] 在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,例如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心从外周血制备白细胞。

[0396] 在任何上述分离步骤中,分离不导致特定细胞群或表达特定标记物的细胞的100%富集或去除。例如,特定类型的细胞(例如表达标记物的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不导致不表达标记物的细胞的完全不存在。同样,特定类型的细胞(例如表达标记物的那些)的阴性选择、去除或消耗是指减少此类细胞的数量或百分比,但不导致所有此类细胞的完全去除。

[0397] 可替代地,可通过可商购获得的细胞培养物获得细胞,该细胞培养物包括但不限于对于T细胞,细胞系BCL2 (AAA) Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2902[™])、BCL2 (S70A) Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2900[™])、BCL2 (S87A) Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2901[™])、BCL2 Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2899[™])、Neo Jurkat (**ATCC**[®] CRL-2898[™])、TALL-104 (**ATCC**[®] CRL-11386);和对于NK细胞,细胞系NK-92 (**ATCC**[®] CRL-2407[™])、NK-92MI (**ATCC**[®] CRL-2408[™])。

[0398] 此类可商购获得的细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心(ATCC) (<http://www.atcc.org/>) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心(<https://www.dsmz.de/>)。

[0399] 细胞制备和扩增

[0400] 无论是在对免疫细胞进行遗传修饰以表达所需的CAR之前还是之后,都可以使用通常已知的方法或从对于当前申请易于调整的方法(例如美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041和美国专利申请公开号20060121005中描述的那些,Life Technologies **Dynabeads**[®] 系统活化和扩增试剂盒;BD Biosciences Phosflow[™] 活化试剂盒,Miltenyi Biotec MACS[™] 活化/扩增试剂盒以及其他对相关细胞的活化部分具有特异性的可商购获得的细胞试剂盒)活化和扩增细胞。用HLA-G抗原离体刺激可以活化和扩展选定的CAR表达细胞亚群。可替代地,可以通过与HLA-G抗原相互作用在体内活化细胞。

[0401] 孵育和/或工程改造可以在培养容器(例如单元、腔室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或用于培养物或培养细胞的其他容器)中进行。

[0402] 在一些实施方案中,在基因工程改造之前或与基因工程改造相关地孵育和/或培养细胞。孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、活化和/或繁殖。在一些实施方案中,将组合物或细胞在刺激条件或刺激剂的存在下孵育。这样的条件包括被设计为诱导群体中细胞的增殖、扩增、活化和/或存活、模拟抗原暴露和/或引发细胞以用于基因工程改造(例如用于引入重组抗原受体)的那些条件。条件可以包括特定培养基、温度、氧气含量、二氧化碳含量、时间、试剂(例如营养素,氨基酸,抗生素,离子和/或刺激因子,例如细胞因子,趋化因子,抗原,结合伴侣,融合蛋白,重组可溶性受体和旨在活化细胞的任何其他试剂)中的一种或多种。

[0403] 在一些实施方案中,本发明的免疫细胞可以通过与组织或细胞共培养而在体外扩增。在将细胞施用至受试者后,还可以在体内例如在受试者的血液中扩增细胞。

[0404] 通常,本发明的T细胞可以例如通过与刺激CD3 TCR复合物和T细胞表面上的共刺激分子的试剂接触以产生T细胞的活化信号而扩增。例如,例如钙离子载体A23187、佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)或促有丝分裂凝集素如植物血凝素(PHA)的化学物质可用于产生T细胞的活化信号。

[0405] 在一些实施方案中,可以通过与例如抗CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗CD2抗体接触或通过蛋白激酶C活化剂(例如,抑菌素)结合钙离子载体接触来在体外刺激T细胞群体。在一些实施方案中,可以通过与Muromonab-CD3(OKT3)接触在体外刺激T

细胞群体。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,可以在刺激T细胞增殖的条件下将一群T细胞与抗CD3抗体和抗CD28抗体一起孵育。

[0406] 在一些实施方案中,通过添加至培养起始组合物饲养细胞例如不分裂的PBMC来使T细胞扩增(例如,使得所得细胞群在待扩增的初始种群中对于每个T淋巴细胞包含至少约5、10、20或40或更多个PBMC饲养细胞);并孵育培养物(例如,足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面,非分裂饲养细胞可包括 γ -辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,PBMC用约3000至3600rads范围内的 γ 射线辐照以防止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群体之前,将饲养细胞添加至培养基。

[0407] 在特定实施方案中,共刺激分子用于增强抗原接合后由CAR产生的T细胞的活化、增殖和细胞毒性。共刺激配体可包括但不限于B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、B7-H3、BAFFR、BTLA、BLAME (SLAMF8)、CD2、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8 β 、CD1a、LFA-1 (CD11a/CD18)、CD1b、CD1c、CD1d、CD18、CD19、CD19a、CD27、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD40、CD40MICA、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD70、CD83、CD84、CD96 (Tactile)、CD 100 (SEMA4D)、CD 103、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、CD160 (BY55)、SELPLG (CD 162)、DNAM1 (CD226)、Ly9 (CD229)、SLAMF4 (CD244、2B4)、ICOS (CD278)、CEACAM1、CDS、CRTAM、DAP10、GADS、GITR、HVEM (LIGHTR)、HLA-G、IA4、ICAM-1、IL2R β 、IL2R γ 、IL7Ra、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAT、LFA-1、LIGHT、LTBR、MICB、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRP1)、PAG/Cbp、PD-1、PD-L1、PD-L2、PSGL1、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNFR2、TRANCE/RANKL、VLA1、VLA-6、诱导型共刺激配体 (ICOS-L)、细胞间粘附分子 (rCAM)、淋巴毒素 β 受体、3TR6、ILT3和ILT4。共刺激配体还特别包括与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体,例如但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体。

[0408] 在一些实施方案中,可以使用白介素-2 (IL-2) IL-15、IL-15/IL-15RA复合物、IL-18和IL-12在体外扩增NK细胞群。

[0409] 适用于T细胞和NK细胞培养的条件包括适当的培养基(例如,基本必需培养基或RPMI培养基1640或X-Vivo 10、X-Vivo 15和X-Vivo 20 (Lonza)),其可包含增殖和存活力所需的因子,包括血清(例如胎牛或人血清)、白介素-2 (IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-2、IL-15、IL-18、IL-21、TGF和TNF,或技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加剂。在一个优选的实施方案中,通过暴露于OKT3和IL-2在体外刺激T细胞。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、Plasmanate和还原剂,例如N-乙酰半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI1640,AIM-V,DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 10, X-Vivo15和X-Vivo 20, Optimizer,并添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素,不含血清或补充有适当量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或足以使T细胞生长和扩增的一种或多种细胞因子的量。

[0410] 抗生素例如青霉素和链霉素仅包括在实验培养物中,而不包括在要注入受试者的细胞培养物中。将靶细胞维持和支持生长所必需的条件下,例如适当的温度(例如37摄氏度)和大气(例如空气加5%CO₂)。暴露于不同刺激时间的T细胞可能表现出不同的特征。

[0411] 在一些实施方案中,制备方法包括在分离、孵育和/或工程改造之前或之后冷冻例

如冷冻保存细胞的步骤。在一些实施方案中,冷冻和随后的解冻步骤去除了细胞群中的粒细胞和在一定程度上去除了单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤以去除血浆和血小板之后,将细胞悬浮在冷冻溶液中。在某些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个实例涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻培养基。然后将其用培养基以1:1稀释,以使DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后将细胞以每分钟1度的速度冷冻至-80℃,并储存在液氮储罐的气相中。

[0412] 在本发明的方法中,NK细胞或T细胞优选在施用至患者前离体扩增至少约5天,优选不少于约10天,更优选不少于约15天,以及最优选不少于约20天。

[0413] 在另一个实施方案中,NK细胞或T细胞在施用至患者之前,与扩增的第0天相比,已扩增至少约100倍,优选至少约200倍,更优选至少约400倍,优选至少约600倍,更优选至少约1000倍,以及甚至更优选至少约1500倍。

[0414] 细胞转导和选择

[0415] 可以根据本发明的核酸构建体转导到免疫细胞中以产生表达根据本发明的抗HLA-G CAR的免疫细胞。在某些实施方案中,转导细胞以包含至少一种本发明的CAR。

[0416] 预期可以将嵌合核酸构建体作为裸DNA或在合适的载体中引入受试者自身的免疫细胞。使用裸DNA通过电穿孔稳定转染免疫细胞特别是T细胞的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利号6,410,319。裸DNA通常是指以适当的表达方向包含在质粒表达载体中的编码本发明的嵌合受体的DNA。有利地,裸DNA的使用减少了产生表达本发明的嵌合受体的T细胞所需的时间。用于将核酸构建体引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。

[0417] 可替代地,将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。多种病毒载体,例如上文所述的载体,可用于将本发明的核酸构建体引入免疫细胞。根据本发明的方法使用的合适的载体不在受试者的免疫细胞中复制。

[0418] 在一个实施方案中,通过病毒载体,特别是如上文所述的慢病毒载体,将根据本发明的编码CAR的核酸构建体引入免疫细胞。

[0419] 可替代地,用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠子和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。在体外和体内用作递送载体的示例性胶体系统是脂质体(例如人工膜囊泡)。

[0420] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞或以其他方式使细胞暴露于本发明的抑制剂的方法,为了确认重组DNA序列在宿主细胞中的存在,可以进行多种测定。这样的测定包括例如本领域技术人员众所周知的“分子生物学”测定,例如Southern和Northern印迹,RT-PCR和PCR;“生化”测定,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹)或通过本文所述的测定来检测特定肽的存在或不存在,以鉴定落入本发明范围内的试剂。测试CAR识别靶细胞的能力和抗原特异性的方法是本领域已知的。例如,Clay等人,J.Immunol.,163:507-513(1999)教导了测量细胞因子(例如,干扰素- γ ,粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)或白介素2(IL-2))的释放的方法。另外,如Zhao等人,J.Immunol.,174:4415-4423(2005)中所述,可以通过测量细胞的细胞毒性来评估CAR功能。

[0421] 一旦确定转染或转导的免疫细胞能够以所需的调节和所需的水平表达嵌合受体作为表面膜蛋白,就可以确定嵌合受体在宿主细胞中是否具有功能以提供所需的信号诱

导。随后,可以将所转导的免疫细胞进一步重新引入或施用至受试者以活化受试者中的抗肿瘤反应。为了促进施用,可以根据本发明的转导的T细胞与药学上可接受的载体或稀释剂制成药物组合物或制成适于体内施用的植入物。

[0422] 一旦将表达根据本发明的CAR的细胞施用至受试者,就可以通过许多已知方法中的任何一种来测量工程改造的细胞群和/或在一些方面抗体的生物学活性。待评估的参数包括工程改造的或天然的T细胞或其他免疫细胞在体内(例如通过成像)或在体外(例如通过ELISA或流式细胞术)与抗原的特异性结合。在某些实施方案中,工程改造的细胞破坏靶细胞的能力可以使用本领域已知的任何合适方法来测量,例如在Kochenderfer等人, *J. Immunotherapy*, 32 (7) :689-702 (2009), 和Herman等人, *J. Immunological Methods*, 285 (1) :25-40 (2004) 中描述的细胞毒性测定法。在某些实施方案中,还可以通过测定某些细胞因子例如GM-CSF、IL-3、MIP-1 α 、TNF- α 、IL-10、IL-13、IFN- γ 或IL-2的表达和/或分泌来测量细胞的生物学活性。

[0423] 在某些方面,通过评估临床结果(例如肿瘤负荷或载荷的降低、肿瘤的稳定、无进展生存或总体生存)来测量生物学活性。

[0424] 药物或兽医组合物

[0425] 本发明还涉及包含如文上所述的抗HLA-G抗体或抗体片段、CAR、核酸构建体、载体和/或细胞的药物或兽医组合物。

[0426] 在一个特定方面,本发明涉及药物或兽医学组合物,其包含细胞,优选免疫细胞,其包含如上文所述的CAR和/或包含如上文所述的编码其的核酸构建体。一方面,药物或兽医组合物可包含至少两个不同的细胞群,第一个细胞群具有包含特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G,优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5的CAR的细胞,以及第二个细胞群具有包含特异性结合无 β 2M的HLA-G,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型的CAR的细胞。另一方面,药物或兽医学组合物可以包含细胞群,所述细胞群包含至少两种CAR,第一CAR特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G,优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5,以及第二CAR特异性结合无 β 2M的HLA-G,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或HLA-G1/无 β 2M和/或HLA-G5/无 β 2M同种型。另一方面,药物或兽医组合物可以包含细胞群,所述细胞群包含双特异性CAR,其允许特异性结合与 β 2M缔合的HLA-G,优选特异性结合HLA-G1和HLA-G5以及特异性结合无 β 2M的HLA-G,优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6,甚至更优选特异性结合HLA-G2和HLA-G6和/或特异性结合HLA-G1/无 β 2M和HLA-G5/无 β 2M同种型。

[0427] 另一方面,药物或兽医组合物可包含表达如上文所述的靶向与 β 2M缔合的HLA-G和/或无 β 2M的HLA-G同种型的CAR或至少两个CAR或双特异性CAR的第一细胞群,以及表达不识别HLA-G但识别已知是CAR治疗(例如抗肿瘤和/或抗病毒治疗)中感兴趣的靶标的CAR的第二细胞群。将理解的是,此类第二CAR表达细胞群不靶向HLA-G。

[0428] 本发明还涉及含有多种本发明的CAR表达细胞,例如T细胞和/或NK细胞的药物或兽医组合物。药物组合物可以另外包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。药物组合物可以任选地包含一种或多种其他药物活性多肽和/或化合物。

[0429] 在一个实施方案中,包含在药物或兽医组合物中的根据本发明的CAR表达细胞的浓度为至少0.001mg/ml、至少0.1mg/ml、至少0.5mg/ml、至少1mg/ml、至少5mg/ml、至少10mg/ml、至少15mg/ml、至少20mg/ml、至少25mg/ml、至少30mg/ml、至少35mg/ml、至少40mg/

ml、至少45mg/ml、至少50mg/ml、至少55mg/ml、至少60mg/ml、至少65mg/ml、至少70mg/ml、至少75mg/ml、至少80mg/ml、至少85mg/ml、至少90mg/ml、至少95mg/ml、至少100mg/ml、至少105mg/ml、至少110mg/ml、至少115mg/ml、至少120mg/ml、至少125mg/ml、至少130mg/ml、至少135mg/ml、至少140mg/ml至少150mg/ml、至少175mg/ml、至少200mg/ml、至少250mg/ml、至少275mg/ml或至少300mg/ml。

[0430] 在另一个实施方案中,包含在药物或兽医组合物中的表达根据本发明的CAR的细胞的浓度为0.001-0.01mg/ml、0.01-0.1mg/ml、0.1-1mg/ml、1-10mg/ml、10-50mg/ml、50-100mg/ml、50-150mg/ml、50-200mg/ml、50-250mg/ml、50-300mg/ml、100-200mg/ml、100-300mg/ml或200-300mg/ml。

[0431] 在另一个实施方案中,药物或兽医组合物包含表达根据本发明的CAR的细胞,特别是至少100个细胞、至少200个细胞、至少400个细胞、至少500个细胞、至少700个细胞、至少1000个细胞、至少1500个细胞、至少2000个细胞、至少3000个细胞、至少5000个细胞、至少10000个细胞、至少100000个细胞、至少100万个细胞、至少1000万个细胞或至少1亿个表达根据本发明的CAR的细胞。

[0432] 可以将根据本发明的药物或兽医组合物配制成用于任何常规的施用途径,包括局部、肠内、口服、肠胃外、鼻内、静脉内、肌内、皮下或眼内施用等。

[0433] 优选地,根据本发明的药物或兽医组合物可以通过肠内或肠胃外施用途径来施用。当肠胃外施用时,根据本发明的药物或兽医组合物优选通过静脉内施用途径来施用。当肠内施用时,根据本发明的药物或兽医组合物优选通过口服施用途径施用。

[0434] 本领域技术人员将理解,本发明的制剂可以与人血等渗,即本发明的制剂具有与人血基本相同的渗透压。这样的等渗制剂通常具有约250mOSm至约350mOSm的渗透压。等渗性可以通过例如蒸气压或冰冻型渗透压计来测量。制剂的张力通过使用张力调节剂来调节。“张力调节剂”是可以被添加到制剂中以提供制剂的等渗性的那些药学上可接受的惰性物质。适用于本发明的张力调节剂包括但不限于糖、盐和氨基酸。

[0435] 用于肠胃外、鞘内或心室内施用的组合物和制剂可包括无菌水溶液,其还可含有缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂,例如但不限于渗透促进剂、梳理剂(carder)化合物和其他药学上可接受的载体或赋形剂。

[0436] 根据本发明的药物或兽医组合物可以进一步包含药学上可接受的媒介物。因此,本发明的其他方面涉及包含载体和一种或多种在本文公开的实施方案中描述的产品(例如包含抗HLA-G CAR、核酸、载体、抗HLA-G抗体或抗体片段的细胞)的组合物。可以对制剂进行灭菌,并且如果需要,可以与不会与制剂的产品(例如包含抗HLA-GCAR、核酸、载体、抗HLA-G抗体或抗体片段的细胞)有害相互作用的辅助剂(例如载体和赋形剂)混合。

[0437] 优选地,本发明的药物或兽医组合物(包括但不限于任何要求保护的组合物)可以包含本文所述的CAR表达细胞,以及下文所述的一种或多种药学或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。理想地,使用不会不利地影响根据本发明的重组细胞的所需免疫增强作用的药学上可接受的形式。

[0438] 为了促进施用,可以将用编码根据本发明的CAR的核酸构建体转导的经转导的免疫细胞(优选T细胞和/或NK细胞)与合适的药学上可接受的载体或稀释剂制成用于体内施用的药物组合物。制备这种组合物的方法已经在本领域中进行了描述(参见,例如,

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 第21版(2005))。

[0439] 特别地,包含CAR表达细胞的群体的制剂可以包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。制剂中包括的赋形剂将具有不同的目的,例如,取决于CAR构建体、所用的细胞亚群以及施用方式。通常将在不存在任何非人组分例如动物血清(例如牛血清白蛋白)的情况下制备并培养包含CAR表达细胞的制剂。

[0440] 所述制剂或组合物还可包含多于一种可用于用结合分子或细胞治疗的特定适应症、疾病或病况的活性成分,优选具有与结合分子或细胞互补的活性的那些,其中各自的活性不会不利地互相影响。此类活性成分合适地以对于预期目的有效的量组合存在。

[0441] 在某些方面,药物或兽医组合物可以采用定时释放(time-released)、延迟释放和持续释放的递送系统,使得组合物的递送发生在要治疗的部位的致敏之前,并且有足够的时间引起其致敏。本领域已知的手段可用于防止或最小化组合物的释放和吸收,直到其到达靶组织或器官,或确保组合物的定时释放。这样的系统可以避免组合物的重复施用,从而增加了对受试者和医师的便利性。

[0442] 受试者、方案和施用

[0443] 本发明涉及本发明的药物组合物或本发明的CAR表达细胞,其用作药物或用于治疗受试者的疾病或病症。它还涉及本发明的药物组合物或本发明的CAR表达细胞在制备用于治疗受试者的疾病或病症的药物中的用途。最后,本发明涉及一种用于治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向该受试者施用治疗有效量的本发明的药物组合物或本发明的CAR表达细胞。

[0444] 根据本发明的人受试者可以是产前阶段的人,新生儿,儿童,婴儿,青少年或成年人,特别是至少40岁的成年人,优选至少50岁的成年人,还更优选至少60岁的成年人,甚至更优选至少70岁的成年人。

[0445] 在一些实施方案中,受试者是用于疾病、过继细胞疗法和/或用于评估毒性结果(例如细胞因子释放综合征(CRS))的经验证的动物模型。

[0446] 在一些实施方案中,例如在用另一种免疫疗法和/或其他疗法(包括化学疗法,放射疗法和/或造血干细胞移植(HSCT),例如同种异体HSCT)治疗之后,受试者患有持续性或复发性疾病。在一些实施方案中,尽管受试者已经变得对另一种疗法有抗性,但施用仍有效地治疗受试者。在一些实施方案中,受试者尚未复发,但是被确定为处于复发风险中,例如处于高复发风险中,并且因此预防性地施用所述化合物或组合物,例如以降低复发的可能性或防止复发。

[0447] 在一些实施方案中,本发明包括将本发明的CAR表达细胞或含有CAR表达细胞的组合物施用至受试者,例如患有疾病、病况或病症、处于患有疾病、病况或病症的风险或怀疑患有疾病、病况或病症的受试者。在一些实施方案中,例如通过过继细胞疗法,例如过继T细胞疗法,将细胞和组合物施用至患有特定疾病或病况的受试者。在一些实施方案中,将细胞或组合物施用至受试者,例如患有疾病或病症或处于患有疾病或病症的风险中的受试者。在一些方面,所述方法由此治疗例如改善疾病或病况的一种或多种症状。在一个优选的实施方案中,已经诊断出受试者患有免疫疾病,优选癌症。自身免疫性疾病或癌症的诊断方法是本领域技术人员众所周知的。

[0448] 在一个特定实施方案中,在施用根据本发明的免疫细胞或根据本发明的药物或兽医组合物之前,受试者已经接受了至少一条治疗线,优选几条治疗线。

[0449] 优选地,定期地,优选在每天和每月之间,更优选地在每天和每两周之间,更优选地在每天和每周之间,甚至更优选地每天施用治疗。在一个特定实施方案中,一天几次,优选一天2或3次,甚至更优选一天3次施用治疗。

[0450] 用根据本发明的载体、根据本发明的免疫细胞或根据本发明的药物或兽医组合物治疗的持续时间优选1天至20周,更优选1天至10周,还更优选1天至4周,甚至更优选1天至2周。在一个特定实施方案中,治疗的持续时间为约1周。可替代地,只要疾病持续存在,治疗就可以持续。

[0451] 药物或兽医组合物的形式、根据本发明的免疫细胞或根据本发明的药物组合物的施用途和施用剂量可以由本领域技术人员根据感染的类型和严重性、以及根据患者尤其是其年龄、体重、性别和一般身体状况进行调节。本发明的组合物可以以多种方式施用,取决于是否需要局部或全身治疗。

[0452] 在过继细胞疗法的情况下,用于过继细胞疗法的细胞的施用方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继T细胞疗法的方法在例如Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85)中描述。参见例如Themeli等人,(2013) Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人,(2013) PLoS ONE 8(4):e61338。

[0453] 本领域技术人员将认识到,尽管可以使用多于一种途径进行施用,但是特定的途径可以提供比另一种途径更直接和更有效的反应。例如,对于治疗黑素瘤相对于吸入可以有利的皮内递送。局部或全身递送可通过将制剂施用(包括施加)或滴入体腔、吸入或吹入气雾剂或通过肠胃外引入(包括肌内,静脉内,门静脉内,肝内,腹膜,皮下或皮内施用)来实现。

[0454] 尽管全身性(静脉内,IV)注射由于其易于施用而在临床应用中受到青睐,但一些临床前研究(Carpenito,等人,(2009) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106:3360-3365;Song,等人,(2011) Cancer Res.71:4617-4627;Parente-Pereira,等人,(2011) J.Clin.Immunol.31:710-718))建议T细胞的区域性(肿瘤内,IT或腹膜内,IP)施用可能提供最佳的治疗效果,这可能部分是由于T细胞向肿瘤的运输增加。例如,已经显示,当通过IP或IT途径递送时,CAR T细胞以最小的全身吸收保留在接种部位(Parente-Pereira,等人,(2011) J.Clin.Immunol.31:710-718)。相反,静脉内施用后,CAR T细胞最初到达肺部,然后重新分布到脾脏、肝脏和淋巴结。另外,由于在T细胞上CAR表达的瞬时性质,RNA CAR-电穿孔的T细胞可能特别适合于区域施用(Zhao等人,(2010) Cancer Res.70:9053-9061)。此外,临床研究已经显示了肿瘤内和腹膜内注射T细胞的可行性和安全性(Canevari等人,(1995) J.Natl.Cancer Inst.87:1463-1469;Duval等人,(2006) Clin.Cancer Res.12:1229-1236)。总的来说,重组T细胞的局部施用途可以提供最佳的治疗效果,并降低“中靶,器官外(off-organ)”毒性的可能性。因此,在一个实施方案中,局部施用(优选通过肿瘤内和腹膜内注射)根据本发明的CAR表达细胞。

[0455] 在一些实施方案中,药物组合物包含有效治疗或预防疾病或病况的量(例如治疗

有效量或预防有效量)的CAR细胞。在一些实施方案中,通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于几天或更久的重复施用,取决于病况,重复治疗直至出现所需的疾病症状抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。可通过组合物的单次推注施用、通过组合物的多次推注施用或通过组合物的连续输注施用来递送所需剂量。待施用的根据本发明的免疫细胞或根据本发明的药物组合物的量可以通过本领域普通技术人员众所周知的标准程序来确定。必须考虑患者的生理数据(例如年龄、胖瘦、体重和健康状况以及接受者的体重,同时治疗的种类(如果有的话),治疗频率和所需效果的性质)和施用途径以确定合适的剂量,以便将治疗有效量施用至患者。特别地,合适的剂量和施用方案可基于临床试验或已建立的基于细胞的疗法(参见,例如Topalian&Rosenberg (1987) *Acta Haematol.* 78Suppl 1:75-6;US 4,690,915)或可以采用交替连续输注策略。

[0456] 在一些实施方案中,肠胃外施用有效量或数量的细胞或包含那些细胞的药物组合物。在一些实施方案中,施用可以是静脉内施用。在一些实施方案中,可以通过在肿瘤内注射直接进行施用。

[0457] 在某些实施方案中,在表达CAR的基因工程改造的细胞的情况下,向受试者施用约一百万至约1000亿个细胞,例如,一百万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞,约2500万个细胞,约5亿个细胞,约10亿个细胞,约50亿个细胞,约200亿个细胞,约300亿个细胞,约400亿个细胞,或上述值中的任意两个所定义的范围),例如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞,约3000万个细胞,约4000万个细胞,约6000万个细胞,约7000万个细胞,约8000万个细胞,约9000万个细胞,约100亿个细胞,约250亿个细胞,约500亿个细胞,约750亿个细胞,约900亿个细胞或上述值中的任意两个所定义的范围),和在一些情况下,约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如约1.2亿个细胞,约2.5亿个细胞,约3.5亿个细胞,约4.5亿个细胞,约6.5亿个细胞,约8亿个细胞,约9亿个细胞,约30亿个细胞,约300亿个细胞,约450亿个细胞)或这些范围之间的任何值,和/或每千克受试者体重的这样的细胞数量。例如,在一些实施方案中,细胞或细胞群的施用可包括每kg体重施用约 10^3 个至约 10^9 个细胞,包括在那些范围内的细胞数量的所有整数值,例如,本发明的细胞组合物可以以一个剂量或多个剂量施用,其中每个剂量包含至少10个细胞/kg体重,至少100个细胞/kg体重;至少1000个细胞/kg体重;至少10,000个细胞;至少100,000个细胞;至少一百万个细胞;至少一千万个细胞;至少1亿个细胞;至少10亿个细胞或至少100亿个细胞/kg体重。

[0458] 特别地,将引入足够数量的经转导的免疫细胞,以实现所需的治疗反应。理想地,有效量或足够数量的分离的经转导的细胞存在于组合物中并被引入受试者,使得建立长期、特异性、抗肿瘤或抗感染剂反应以减少肿瘤的大小或再生长或感染原的生长(而这在不进行此类治疗的情况下会被引起)。理想地,重新引入受试者的经转导的免疫细胞(优选T细胞)的量与其中不存在经转导的免疫细胞的在其他方面相同的条件相比引起肿瘤大小减少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或100%。

[0459] 可以以单位剂型提供本发明的组合物,其中每个剂量单位(例如一次注射)包含单独的或与其他活性剂适当组合的预定量的组合物。如本文所用,术语单位剂型是指适合作为用于人和动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位包含单独的或与其他活性剂组合的预定量的本发明的组合物,以足以产生所需效果的量计算,在适当的情况下,与药学上可接受的稀释剂、承载体或媒介物结合。本发明的新型单位剂型的规格取决于特定

受试者中与药物组合物相关的特定药效学。

[0460] 细胞或细胞群可以以一个或多个剂量施用。在一些实施方案中,所述有效量或数量的细胞可以作为单个剂量施用。在一些实施方案中,所述有效量或数量的细胞可以在一段时间内作为多于一个剂量施用。施用时间在主管医师的判断范围内,并取决于患者的临床病况。尽管个体需求各不相同,但是确定特定疾病或病况的给定细胞类型的有效量的最佳范围在本领域技术人员的能力范围内。有效量是指提供治疗或预防益处的量。

[0461] 为了本发明的目的,所施用的本发明的CAR材料的量或剂量应足以在合理的时间范围内在受试者中产生治疗或预防反应。例如,本发明的CAR材料的剂量应足以结合抗原,例如一种或多种HLA-G同种型,或在施用后约2小时或更长时间(例如约12至约24或更多个小时)内检测、治疗或预防疾病。在某些实施方案中,时间段可以甚至更长。剂量将由特定的本发明的CAR材料的功效和受试者的病况以及待治疗的受试者的体重决定。

[0462] 为了本发明的目的,一种测定法(其包括例如比较表达本发明的CAR、多肽或蛋白质的T细胞在施用给定剂量的此类T细胞至哺乳动物后在一组哺乳动物(其各自被给予不同剂量的T细胞)中裂解靶细胞或分泌IFN- γ 的程度)可用于确定要施用至哺乳动物的起始剂量。施用一定剂量后,裂解靶细胞或分泌IFN- γ 的程度可以通过本领域已知的方法进行测定。

[0463] 用途

[0464] 用于治疗疾病或病症以及联合治疗的用途

[0465] 一方面,要治疗的疾病或病症是选自以下的病况:增生性疾病或病症,优选癌症;传染性疾病或病症,优选病毒感染;炎性疾病或病症;以及免疫疾病或病症,优选自身免疫或自身免疫疾病,过敏和移植物抗宿主排斥。在一些实施方案中,病况可以是癌症。

[0466] 本发明涉及本发明的抗体、细胞、核酸构建体、载体和/或药物组合物用于干扰或中和有此需要的宿主中由HLA-G蛋白引起的免疫下调的用途。

[0467] 特别地,根据本发明的细胞、核酸构建体、载体和/或药物组合物特别适合于治疗病毒感染,例如HIV-1、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染。

[0468] 特别地,根据本发明的细胞、核酸构建体、载体和/或药物组合物特别适合于治疗癌症,特别是实体瘤或造血系统癌症,甚至更优选地,当良好的选择性单一靶标的可获得性是有限的时。

[0469] 免疫系统可以基于其在恶性细胞转化过程中诱导的肿瘤特异性抗原或分子的表达特异性地鉴定和消除肿瘤细胞。该过程称为肿瘤免疫监视。尽管有肿瘤免疫监视,但在免疫系统正常运作的情况下,肿瘤仍会发展。这是通过肿瘤免疫编辑发生的,该过程包括三个主要阶段:1) 消除阶段,其中大多数免疫原性肿瘤细胞被细胞毒性T和NK细胞消除;2) 平衡阶段,其中选择具有降低的免疫原性的肿瘤细胞;和3) 逃逸阶段,其中不再响应宿主免疫系统的变体得以维持(Urosevic和Dummer, 2008)。HLA-G通过减少肿瘤细胞的消除、通过抑制T细胞和NK细胞的细胞毒性功能以及通过胞吞作用(即活的HLA-G分子的细胞间转移)而参与肿瘤免疫编辑的每个阶段,其致使感受态细胞毒性细胞对肿瘤抗原无反应(LeMaoult等人, 2007; Caumartin等人, 2007)。因此,本发明的嵌合构建体可用于患有或怀疑患有疾病、病症或特定病况的受试者,特别是患有或怀疑患有癌症的受试者。特别地,本发明的嵌合构建体可用于患有或怀疑患有癌症的受试者,从而在这些受试者中减小肿瘤的大小或防止肿瘤的

生长或再生长或防止诱导免疫抑制性微环境。

[0470] 因此,本发明还涉及用于在有此需要的受试者中抑制肿瘤生长和/或用于治疗有此需要的癌症患者的方法。肿瘤可以是实体瘤或液体瘤。在一些实施方案中,肿瘤或癌症表达或过表达HLA-G。在某些实施方案中,这些方法包括向受试者或患者施用有效量的分离的细胞,或可替代地基本上由其组成,或进一步由其组成。在另外的实施方案中,表达根据本发明的CAR的细胞是T细胞或NK细胞。分离的细胞对于所治疗的受试者或患者可以是同种异体的或自体的。另一方面,肿瘤表达或过表达HLA-G抗原,并且已经通过诊断选择了用于治疗的受试者。

[0471] 在一个实施方案中,本发明涉及通过将本发明的嵌合构建体引入受试者的免疫细胞(优选地T细胞或NK细胞)并将经转化的免疫细胞重新引入受试者中,从而表达根据本发明的CAR并实现抗肿瘤反应以减少或消除受试者中的肿瘤,来减少受试者中的肿瘤生长或预防肿瘤形成的方法。将核酸构建体递送至受试者的步骤通常涉及将本发明的核酸构建体引入分离的免疫细胞(例如,从PBMC分离的自体免疫细胞或衍生自同种异体第三方衍生的免疫细胞供体的免疫细胞),并将经转化的免疫细胞引入受试者中,从而实现抗肿瘤反应,以减少或消除受治疗者中的肿瘤,如在过继性T细胞治疗方法中一样。例如,免疫细胞可以包含T细胞,并且受试者罹患或被认为罹患或被诊断患有肿瘤或癌症,例如表达HLA-G的癌症。例如,可以将本发明的示例性核酸构建体编码的抗HLA-G CAR分子以经工程改造以表达抗HLA-G CAR分子的重组免疫细胞的形式施用至受试者。

[0472] 根据本发明的和通过上述方法获得的CAR表达细胞或衍生自此类细胞的细胞系可用作治疗受试者的疾病、病症或病况的药物。在一些实施方案中,这样的药物可以用于治疗癌症。

[0473] 在一些实施方案中,对受试者施用治疗可包括使用从受试者或从一个或多个供体收获的免疫细胞的过继细胞疗法(ACT)。因此,细胞可以是对受试者而言是异种的、同种异体的或自体的细胞。通常,细胞对受试者是自体的。

[0474] 在一些实施方案中,通过自体转移进行细胞疗法,例如过继细胞疗法,例如过继T细胞疗法,其中从要接受细胞疗法的受试者或来自此类受试者的样品中分离和/或制备细胞。因此,在一些方面,所述细胞衍生自需要治疗的受试者,例如患者,并且在分离和加工后将所述细胞施用至同一受试者。

[0475] 在一些实施方案中,通过同种异体转移进行细胞疗法,例如过继细胞疗法,例如过继T细胞疗法,其中从要接受治疗的受试者以外的受试者或最终接受细胞疗法的受试者例如第一受试者分离和/或制备细胞。在这样的实施方案中,然后将细胞施用至相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上相似。在一些实施方案中,第二受试者表达与第一受试者相同的HLA类别或超类型。本发明的细胞可能能够杀死靶细胞,例如癌细胞。靶细胞可以通过抗原表达的确定模式(例如抗原A或抗原B的表达)来识别。

[0476] 在一些实施方案中,ACT可包括从受试者或一个或多个供体分离原代免疫细胞,用任何前述实施方案的一种或多种核酸构建体转导原代免疫细胞,在经转导的原代免疫细胞中表达CAR,并将经转导的免疫细胞递送到受试者中。ACT可进一步包括在将经转导的免疫细胞递送至受试者之前刺激和/或扩增免疫细胞。

[0477] 例如,在一些实施方案中,ACT可包括收获自体或同种异体T细胞,并用一种或多种核酸构建体转导这些T细胞,以使T细胞表达介导促炎性细胞因子表达的CAR,然后将细胞注入有此需要的受试者中。

[0478] 本发明还提供了一种治疗癌症的方法,其包括将有效量的根据前述实施方案中任一项的核酸构建体、一种或多种载体或经转导的免疫细胞或药物组合物递送至有此需要的受试者,从而治疗癌症。在一些实施方案中,可以通过减少肿瘤细胞负荷或通过增加存活来测量癌症的治疗。

[0479] 本发明另外提供了一种免疫治疗的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的根据前述实施方案中任一项的一种或多种核酸构建体、一种或多种载体、重组细胞或药物组合物。用本发明的细胞进行的治疗可以帮助防止通过标准程序常常发生的肿瘤细胞的逃逸或释放。

[0480] 在某些实施方案中,以多种方式修饰CAR表达细胞,从而增加其治疗或预防功效。例如,CAR可以通过接头直接或间接地缀合至靶向部分。将化合物例如CAR缀合至靶向部分的实践是本领域已知的。参见,例如,Wadhwa等人,J. Drug Targeting 1995;3(2):111-127 和美国专利号5,087,616。特别地,本发明包括一种类型的细胞疗法,其中对分离的细胞进行基因修饰以表达CAR,并将CAR细胞注入有此需要的受试者中。这样的施用可以以靶标特异性方式促进细胞的活化(例如,T细胞活化),使得疾病或病症的细胞被靶向破坏。在细胞为T细胞的情况下,与抗体疗法不同,CAR T细胞能够在体内复制,从而导致长期持续存在,这可能导致对靶标疾病、病症或病况的持续控制。

[0481] 本文所公开的CAR表达细胞可以单独地或与稀释剂、已知的抗癌治疗剂和/或其他组分如细胞因子或其他具有免疫刺激作用的细胞群联合施用。它们可以作为第一线疗法、第二线疗法、第三线疗法或进一步的疗法来施用。

[0482] 在一些实施方案中,CAR表达细胞作为联合治疗的一部分施用,例如与另一种治疗干预措施(例如抗体或工程改造的细胞或受体或试剂,例如细胞毒性或治疗剂)同时或以任何顺序依次进行。在一些实施方案中,将细胞或抗体与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗干预措施相结合地同时或以任何顺序依次地共同施用。在一些情况下,将细胞与另一种疗法以足够接近的时间共同施用,以使细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的作用,反之亦然。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之前施用细胞或抗体。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂例如抗癌剂之后施用细胞或抗体。“抗癌”剂能够例如通过杀死癌细胞、诱导癌细胞凋亡、降低癌细胞的生长速率、降低转移瘤的发生率或数量、减小肿瘤大小、抑制肿瘤生长、减少向肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫反应、预防或抑制癌症的进展或延长患有癌症的受试者的寿命而对受试者的癌症产生负面影响。更一般地,将以有效杀死细胞或抑制细胞增殖的组合量提供这些其他组合物。该过程可以包括使癌细胞与表达根据本发明的CAR的细胞和一种或多种药剂或多种因子同时接触。这可以通过使细胞与包含两种药剂的单一组合物或药理制剂接触,或使细胞与两种不同的组合物或制剂(其中一种组合物包含表达构建体,另一种包含一种或多种第二药剂)同时接触来实现。

[0483] 在一个特定实施方案中,将表达根据本发明的针对HLA-G同种型的CAR的细胞作为联合治疗的一部分施用,例如与不识别HLA-G但已知可用于其他CAR疗法例如抗肿瘤和/或

抗病毒CAR疗法的其他CAR表达细胞同时或以任何顺序依次施用。这样的CAR表达细胞靶向与疾病(优选地例如癌症或病毒感染)有关的抗原,优选地在癌症疗法或病毒疗法中靶向的抗原。应该理解,这种抗原不是HLA-G。

[0484] 在本发明的上下文中,预期细胞疗法可类似地与化学疗法、放射疗法或免疫疗法干预以及促凋亡或细胞周期调节剂如免疫检查点抑制剂联合使用。

[0485] 可替代地,本发明的治疗可以在其他药剂治疗之前或之后,间隔从几分钟到几周。在其中将其他药剂和本发明分别施加至个体的实施方案中,通常将确保在每次递送的时间之间不超过显著的时间段,使得该药剂和本发明的疗法仍将能够对细胞发挥有利地组合的作用。在这样的情况下,将预期的是,可以在彼此的约12-24h之内,并且更优选地在彼此的约6-12h之内,使细胞与该两种形式接触。在一些情况下,可能希望显著延长治疗时间,但是,在各自施用之间过去了几天(2、3、4、5、6或7)到几周(1、2、3、4、5、6、7或8)的时间。

[0486] 预期将根据需要重复治疗周期。还预期可以将各种标准疗法以及外科手术干预与本发明的细胞疗法组合应用。

[0487] 靶向的癌症

[0488] HLA-G在许多人原位实体恶性肿瘤和恶性造血疾病(包括乳腺癌、卵巢癌、透明肾细胞癌、结直肠癌、胃癌、食道癌、肺癌和肝细胞癌,以及急性髓细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL))中异常表达。HLA-G在恶性肿瘤中的异常表达与患有结直肠癌(CRC)、胃癌(GC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、食道鳞状细胞癌(ESCC)、乳腺癌、肝细胞癌和B-CLL的患者的不良临床结果显著相关。此外,与正常健康对照或良性疾病病例相比,各种类型的癌症患者(包括患有黑色素瘤、急性白血病、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、淋巴增生性疾病、乳腺癌或卵巢癌、非小细胞肺癌、食道癌、结直肠癌、胃癌和肝细胞癌的患者)中血清可溶性HLA-G增加。

[0489] 可以由根据本发明的CAR表达细胞、核酸构建体、载体或药物组合物治疗的癌症包括未血管化或尚未充分血管化的肿瘤,以及已血管化的肿瘤。

[0490] 根据本发明的CAR表达细胞、核酸构建体、载体或药物组合物可以用于治疗口腔和咽部的癌症,包括舌、口腔和咽部的癌症;消化系统癌症,包括食道癌、胃癌和结肠直肠癌;肝和胆道系统的癌症,包括肝细胞癌和胆管癌;呼吸系统癌症,包括支气管癌、肺癌和喉癌;骨和关节癌,包括骨肉瘤;皮肤癌,包括黑色素瘤;乳腺癌;生殖道癌症,包括女性的子宫癌、子宫内膜癌、卵巢癌和宫颈癌,男性的前列腺癌和睾丸癌;肾道癌,包括肾细胞癌和输尿管或膀胱的移行细胞癌;胃肠道间质瘤,胰腺癌,肾癌,结肠癌,宫颈癌,脑癌,包括神经胶质瘤,多形成胶质细胞瘤和成神经管细胞瘤;内分泌系统的癌症,包括甲状腺癌、肾上腺癌和与多种内分泌肿瘤综合征相关的癌症;淋巴瘤,包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤;B细胞淋巴瘤,单核细胞淋巴瘤,边缘区淋巴瘤,伯基特氏淋巴瘤,T和B淋巴瘤,多发性骨髓瘤和浆细胞瘤;急性和慢性白血病,前血细胞性白血病(prohemocytic leukemia),急性非淋巴细胞性白血病(ANLL),急性淋巴母细胞性白血病(ALL),红白血病,髓样或淋巴样白血病;以及其他未指明部位的癌症,包括神经母细胞瘤。优选地,癌症选自肾细胞癌(RCC)、黑色素瘤、肾癌和膀胱癌。

[0491] 癌症可包括非实体瘤(例如血液肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或可包括实体瘤。如本文所用,“实体瘤”是通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性或恶

性的。不同类型的实体瘤因形成它们的细胞类型而命名(例如肉瘤,癌和淋巴瘤)。

[0492] 实体瘤例如肉瘤和癌的实例包括纤维肉瘤,粘液肉瘤,脂肪肉瘤,软骨肉瘤,骨肉瘤和其他肉瘤,滑膜瘤,间皮瘤,尤因氏肿瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,结肠癌,淋巴样恶性肿瘤,胰腺癌,乳腺癌,肺癌,卵巢癌,前列腺癌,肝细胞癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,髓样甲状腺癌,乳头状甲状腺癌,嗜铬细胞瘤皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝癌,胆管癌,绒毛膜癌,威尔姆斯瘤,宫颈癌,睾丸肿瘤,精原细胞瘤,膀胱癌,黑色素瘤和CNS肿瘤(例如神经胶质瘤(例如脑干神经胶质瘤和混合神经胶质瘤),胶质母细胞瘤(也称为多形胶质母细胞瘤)星形胶质细胞瘤,CNS淋巴瘤,生殖细胞瘤,成神经管细胞瘤,神经鞘瘤颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,血管母细胞瘤,听神经瘤,少突胶质细胞瘤,脑膜瘤,神经母细胞瘤,视网膜母细胞瘤和脑转移瘤)。

[0493] 血液癌症是血液或骨髓的癌症。血液学(或造血性)癌症的实例包括白血病,包括急性白血病(例如急性淋巴细胞性白血病,急性髓细胞性白血病,急性骨髓性白血病和成髓细胞性、早幼粒细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红血球性白血病),慢性白血病(例如慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病,慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞性白血病),真性红细胞增多症,淋巴瘤,霍奇金病,非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级别形式),多发性骨髓瘤,瓦尔登斯特罗姆巨球蛋白血症,重链疾病,骨髓增生异常综合征,毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0494] 在一些实施方案中,癌细胞表达或过表达HLA-G。在一个特定实施方案中,癌细胞表达或过表达选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7的1至6种,优选2至5种HLA-G同种型,优选选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5或HLA-G6,更优选选自HLA-G1或HLA-G2。

[0495] 优选地,癌细胞表达或过表达HLA-G1和/或HLA-G5;或癌细胞表达或过表达HLA-G2和/或HLA-G6。优选地,当此类癌细胞表达这些特定的HLA-G同种型时,根据本发明的CAR分别特异性结合HLA-G1和HLA-G5或HLA-G2和HLA-G6。

[0496] 用于诊断和预后

[0497] 本文公开的抗HLA-G单克隆抗体或scFv也可用于诊断和预后方法。因此,本发明涉及本文公开的抗体在诊断受试者的HLA-G相关医学病况中的用途。

[0498] 本文公开的单克隆抗体或scFv可用于本领域已知的与HLA-G多肽的定位和/或定量有关的方法(例如,用于测量合适的生理样品内的HLA-G多肽的水平,用于诊断方法,用于多肽成像等)。本文公开的单克隆抗体或scFv可用于通过标准技术(例如蛋白质印迹,用于分离细胞的亲和层析方法或用于基于流式细胞术的细胞分析或细胞分选或免疫沉淀)分离HLA-G多肽。本文公开的HLA-G抗体可以促进从生物样品(例如哺乳动物血清或细胞)中纯化天然HLA-G多肽,以及纯化在宿主系统中表达的重组产生的HLA-G多肽。此外,HLA-G单克隆抗体或scFv可用于检测HLA-G多肽(例如,在血浆,细胞裂解液或细胞上清液中),以评估多肽的丰度和表达模式。本文公开的HLA-G抗体可作为临床测试程序的一部分用于诊断监测组织中的HLA-G水平,例如以确定给定治疗方案的功效。通过将本文公开的HLA-G抗体偶联(即物理连接)到可检测物质(从而HLA-G抗体或其片段被可检测地标记)可以促进检测。关于抗体,术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即物理连接)至抗体而直接标记抗体,以及通过与被直接标记的另一种化合物的反应性来间接标记抗体。间接标记的非限制

性实例包括使用荧光标记的二抗检测一抗,和用生物素对DNA探针进行末端标记,以便可以用荧光标记的链霉亲和素对其进行检测。

[0499] 本公开内容的检测方法可以用于在体外以及体内检测生物样品中的HLA-G多肽的表达水平。用于检测HLA-G多肽的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、流式细胞术、免疫沉淀、放射免疫测定和免疫荧光(例如IHC)。此外,用于检测HLA-G多肽的体内技术包括将标记的抗HLA-G抗体引入受试者。仅作为实例,可以用放射性标记物标记抗体,可以通过标准成像技术检测该放射性标记物在受试者中的存在和位置。

[0500] 在一些方面,含有促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放的结构修饰的HLA-G抗体可用于体内成像检测方法。在一些方面,HLA-G抗体在抗体的CH2恒定重链区域中包含缺失,以促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,Fab片段用于促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,F(ab)'₂片段用于促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。

[0501] 因此,本发明还提供了用于确定受试者是否有发展与增加的HLA-G多肽表达或活性相关的医学疾病或病况的风险的预后(或预测)测定(例如,癌前细胞的检测)。这样的测定可以用于预后或预测目的,从而在以HLA-G多肽表达为特征或与之相关的医学疾病或病况发作之前预防性地治疗个体。

[0502] 本公开内容的另一方面提供了用于确定受试者中HLA-G表达的方法,从而为该受试者选择合适的治疗或预防化合物。

[0503] 可替代地,可以使用预后测定法来鉴定具有发展癌症和/或实体瘤或处于发展癌症和/或实体瘤的风险的受试者。因此,本公开内容提供了用于鉴定与增加的一种或多种HLA-G同种型表达水平相关的疾病或病况的方法,其中从受试者获得测试样品并检测一种或多种HLA-G同种型,其中与对照样品相比HLA-G多肽的增加的水平的存在预测患者具有与增加的一种或多种HLA-G同种型表达水平相关的疾病或病况或处于发展其的风险中。在一些方面,与增加的一种或多种HLA-G同种型表达水平相关的疾病或病况选自发展中的癌症和/或实体瘤。

[0504] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了用于确定受试者是否可以用针对与增加的HLA-G表达相关的病症或病况的化合物有效治疗的方法,其中从受试者获得生物样品和使用如上文所述的HLA-G抗体或ScFv检测一种或多种HLA-G同种型。测定从受试者获得的生物样品中的HLA-G多肽的表达水平,并将其与在从无疾病的受试者获得的生物样品中发现的HLA-G表达水平进行比较。与从健康受试者获得的样品相比,从怀疑患有疾病或病况的受试者获得的样品中HLA-G的水平升高指示了在测试的受试者中与HLA-G相关的疾病或病况。

[0505] 存在许多疾病状态,其中已知升高的一种或多种HLA-G同种型的表达水平指示患有疾病的受试者是否可能对特定类型的疗法或治疗有反应。因此,检测生物样品中的一种或多种HLA-G同种型的方法可以用作预后方法,例如,以评估受试者对疗法或治疗反应的可能性。

[0506] 本公开内容的其他方面涉及用于确定患者是否可能或不太可能对HLA-G CAR疗法有反应的方法。在特定实施方案中,所述方法包括使从患者分离的肿瘤样品与有效量的HLA-G抗体接触,并检测与该肿瘤样品结合的任何抗体的存在。在进一步的实施方案中,与肿瘤样品结合的抗体的存在表明患者可能对HLA-G CAR疗法有反应,而与肿瘤样品结合的

抗体的缺乏则表明患者不太可能对HLA-G疗法有反应。在一些实施方案中,所述方法包括向被确定为可能对HLA-G CAR疗法有反应的患者施用有效量的HLA-G CAR疗法的附加步骤。

[0507] 本公开内容的其他方面涉及用于依赖于由肿瘤表达的一种或多种同种型确定患者是否可能或不太可能对HLA-G CAR疗法有反应的方法,所述同种型特别地选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7,优选选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5或HLA-G6,以及更优选选自HLA-G1或HLA-G2,甚至更优选HLA-G1和G5或HLA-G2和G6。治疗前对表达的一种或多种HLA-G同种型的鉴定允许选择用于有效治疗(例如细胞疗法)的最合适的CAR,其特异性结合选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7的1至6种,优选2至5种HLA-G同种型,优选选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5或HLA-G6,以及更优选选自HLA-G1或HLA-G2,甚至更优选结合HLA-G1和HLA-G5同种型或HLA-G2和HLA-G6同种型。

[0508] 试剂盒

[0509] 本文所述的任何组合物可包含在本发明提供的试剂盒中。因此,试剂盒将在合适的容器中包括本发明的重组/工程改造的细胞,和/或编码本发明的核酸构建体的载体,和/或本发明的核酸构建体或相关试剂。在一些实施方案中,试剂盒进一步包括用于治疗癌症或感染性疾病的另外的试剂,并且所述另外的试剂可以与本发明的一种或多种核酸构建体或细胞或试剂盒的其他组分组合,或者可以试剂盒在中单独提供。在一些实施方案中,可以在试剂盒中提供从个体获取样品和/或测定样品的工具。在某些实施方案中,试剂盒包括例如细胞、缓冲液、细胞培养基、载体、引物、限制酶、盐等。试剂盒还可包含用于包含无菌的、药学上可接受的缓冲液和/或其他稀释剂的工具。

[0510] 试剂盒的组分可以包装在水性介质中或以冻干形式包装。试剂盒的容器工具通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器工具,可以将组分放置在其中,并且优选地适当地等分。在试剂盒中有多于一种组分时,则试剂盒通常还将包含第二、第三或其他另外的容器,可以将另外的组分单独放入其中。但是,组分的各种组合可以包含在小瓶中。这样的容器可以包括将期望的小瓶保留在其中的注射或吹塑塑料容器。本发明的试剂盒通常还将包括用于密闭容纳组分以用于商业销售的工具。这样的容器可以包括将期望的小瓶保留在其中的注射或吹塑塑料容器。

[0511] 当试剂盒的组分以一种和/或多种液体溶液形式提供时,液体溶液是水溶液,其中无菌水溶液是特别优选的。组合物也可以配制与注射器相容的组合物。在这种情况下,容器装置本身可以是注射器、移液器和/或其他类似装置,从中可以将制剂施加至身体的感染区域、注入动物中和/或甚至施加至试剂盒的其他组分和/或与试剂盒的其他组分混合。然而,试剂盒的组分可以以一种或多种干粉的形式提供。当试剂和/或组分以干粉形式提供时,可以通过添加合适的溶剂来重构粉末。设想了溶剂也可以在另一容器工具中提供。

[0512] 在本发明的特定实施方案中,在试剂盒中提供了待用于细胞疗法的细胞,并且在一些情况下,细胞基本上是试剂盒的唯一组分。试剂盒可包含用于制备所需细胞的试剂和材料。在特定实施方案中,试剂和材料包括用于扩增所需序列的引物、核苷酸、合适的缓冲液或缓冲剂、盐等,并且在一些情况下,试剂包括编码本文所述的CAR和/或用于其的调节元件的载体和/或DNA。

[0513] 在特定实施方案中,试剂盒中存在一种或多种装置,其适于从个体提取一种或多种样品。该装置可以是注射器、手术刀等。

[0514] 在本发明的一些情况下,除了细胞疗法实施方案之外,试剂盒还包括第二癌症疗法,例如化学疗法和/或免疫疗法。一种或多种试剂盒可以针对个体的特定癌症而定制,并且包括如上文所述的针对个体的相应的第二癌症疗法。

实施例

[0515] 结果

[0516] 抗HLA-G抗体互补位特异性

[0517] 先前已经描述了可以表达包含1至3个球状结构域(与 β 2M缔合或不缔合)和肽的HLA-G的不同同种型。先前已经针对HLA-G的不同区域或“表位”产生了不同的特异性抗HLA-G抗体。先前已经确定了针对HLA-G的不同同种型的抗HLA-G单克隆抗体的特异性。简而言之,如图2A所示,15E7抗体对HLA-G1/5无 β 2M和HLA-G6具有高亲和力,表明该Mab对与 β 2M缔合HLA-G同种型具有特异性。如图2B所示,与特异于与 β 2M缔合的HLA-G同种型的MEM-G/09单克隆抗体相比,在用15E7单克隆抗体染色后,K562 HLA-G1p呈现比K562 HLA-G1Lv更高的无 β 2M的HLA-G比例(数据未显示)。类似地,评估了针对Jurkat wt、Jurkat HLA-G1Lv和Jeg-3细胞系的15E7特异性,这表明15E7单克隆抗体呈现对无 β 2M的HLA-G同种型的高亲和力,如图2B所示。

[0518] 执行相同的实验确定LFTT-1单克隆抗体的特异性。与15E7抗体相反,LFTT-1抗体对与 β 2M缔合的HLA-G同种型具有高特异性并对K562 HLA-G1Lv、Jurkat HLA-G1Lv和Jeg-3细胞系进行染色,如图2C所示。

[0519] CAR构建验证

[0520] 基于15E7和LFTT-1单克隆抗体互补位产生了针对HLA-G的两种不同的嵌合抗原受体。CAR设计对应于已经描述的第三代CAR(Pulè等人,2005Molecular Therapy),其由以下组成:信号肽,15E7或LFTT-1的scFv,包含(i) CD8a或CD28铰链、(ii) 人IgG4铰链结构域、(iii) 人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4结构域或(iv) 突变的CH2人IgG4结构域、人IgG4铰链结构域和CH3人IgG4铰链结构域或由其组成的间隔结构域,CD28跨膜区,和两个共活化段:4-1BB和CD3 ζ 。图3总结了具有CD8a或CD28铰链结构域的基于15E7和LFTT-1的CAR结构的示意设计,以及图4总结了具有可裂解的接头P2A和截短的hCD19作为报告分子的基于15E7和LFTT-1的CAR结构的示意设计。

[0521] 将CAR构建体移植到不同的效应宿主细胞中:Jurkat细胞系(人CD4⁺T细胞)和NKT1.2(鼠iNKT),并通过流式细胞术和免疫荧光显微术评估CAR表面表达。87.6%的Jurkat HLA-G-15E7和83.2%的HLA-G-LFTT-1 CAR转导的细胞的在其表面表达嵌合受体,这通过抗Flag抗体检测,表明效应细胞强烈表达CAR构建体(图5A)。类似地,NKT 1.2 HLA-G-15E7和HLA-G-LFTT-1 CAR在其表面强烈表达HLA-G CAR,因为85.2%和85.1%分别被抗Flag抗体染色。如图5B所示,还通过免疫荧光显微术确定了CAR细胞表面表达。

[0522] 活化测定:通过CAR/HLA-G1相互作用进行膜采集

[0523] 先前已证明免疫细胞从靶细胞例如APC或肿瘤细胞抗原呈递细胞获得细胞表面膜片。通过效应细胞从靶细胞进行膜获取(i) 需要细胞间接触,(ii) 是快速的,并且(iii) 是依赖于获得细胞的活化状态的活跃过程,其(iv) 反映了效应细胞的抗原特异性活化。因此,膜转移与功能成熟的免疫细胞的活化有关。

[0524] 基于这些原理,设计了一个测试来确定效应细胞在面对靶标受试者:HLA-G分子时的活化程度。通过使用Jurkat T细胞系作为效应细胞和靶细胞来建立实验,从而允许避免旁观者蛋白相互作用。这意味着细胞间接触只能通过CAR-抗原相互作用来介导。如图6A所示,只有用抗HLA-G CAR转染的那些细胞预期被活化,因此,当用靶细胞攻击时将呈现膜获取,并且对照细胞(Jurkat wt)的膜转移非常低或没有。

[0525] 为了表征主要在HLA-G转导的Jurkat靶细胞上表达的同种型,使用抗与 β 2M缔合的HLA-G的MEM-G/09抗体和抗HLA-G- α 3无 β 2M的15E7抗体,通过流式细胞术确定HLA-G同种型表达。图6B显示Jurkat HLA-G1靶细胞仅表达与 β 2M缔合的HLA-G1的同种型,并且在15E7染色后未观察到染色,这意味着没有表达HLA-G- α 3无 β 2M同种型。

[0526] 然后评估膜转移的水平,换句话说,评估用其靶标攻击的效应细胞的活化程度。当面对对照Jurkat wt时,Jurkat HLA-G-15E7和HLA-G-LFTT-1 CAR细胞的膜获得率为5.91%和5.38%。但是,考虑到在靶细胞上表达的HLA-G同种型的性质(与 β 2M缔合的HLA-G1),预期只有HLA-G-LFTT-1 CAR特异性结合并因此活化效应细胞。实际上,Jurkat HLA-G-LFTT-1 CAR获得率增加到21.7%,而Jurkat HLA-G-15E7 CAR活化率保持在5.6%。这些结果示于图6C。

[0527] 然后,基于在对照非特异性细胞(Jurkat wt细胞系)上设定基线的“活化指数”比例,研究用特定靶细胞攻击的HLA-G-15E7 CAR和HLA-G-LFTT-1 CAR细胞的活化程度。如图6D所示,当用Jurkat HLA-G1Lv攻击时,Jurkat HLA-G-LFTT-1 CAR被活化超过3倍。但是,当用Jurkat对照攻击时,活化不增加,当用非特异性靶标(Jurkat wt和Jurkat HLA-G1Lv)攻击时,HLA-G-15E7 CAR细胞也不被活化。

[0528] 最后,评估其他免疫细胞亚群的活化状态,以确定HLA-G-15E7CAR和HLA-G-LFTT-1 CAR构建体的特异性和生物学活性。如图7A所示,使用K562wt细胞作为对照,用特定靶标:K562 HLA-G1p(其主要表达无 β 2M的HLA-G同种型)攻击Jurkat HLA-G-15E7 CAR。再次,观察到活化增加超过3倍。此外,测试了NKT 1.2 HLA-G-15E7和HLA-G-LFTT-1 CAR细胞,其用Jeg-3(人绒毛膜癌细胞,表达与 β 2M缔合的HLA-G1同种型)攻击。与NKT 1.2 HLA-G-15E7或NKT1.2对照细胞相比,只有HLA-G-LFTT-1 CAR细胞被显著活化,如图7B所示。

[0529] HLA-G CAR T细胞的细胞溶解功能和IFN- γ 分泌

[0530] 评估了表达15E7和LFTT-1 CAR的效应细胞对JEG-3、K562和K562-HLA-G1转染的细胞系的细胞毒性功能(图8和9)。为此,将靶细胞用CFSE标记,然后与CAR-T细胞以指定的效应:靶标比例(E:T)共培养24h。共孵育24小时后,收集培养基以确定IFN- γ 分泌,并回收细胞以通过流式细胞术研究靶细胞裂解。

[0531] 与所用铰链无关,K562细胞系不会被抗HLA-G LFTT-1和15E7CAR-T细胞裂解,因为K562细胞在其表面不表达HLA-G蛋白(图8A)。K562-HLA-G1P细胞系在其表面表达与 β 2M缔合的HLA-G1和无 β 2M的同种型(分别为图2B和2C),与活化但未转导的T细胞相比,以10:1的E:T比例其被LFTT-1和15E7 CAR-T细胞几乎完全裂解。与其IgG4或IgG4+mCH2-CH3对应物相比,IgG4+CH3铰链15E7 CAR-T和LFTT-1细胞显示出稍低的效率。根据其细胞毒性功能,在效应CAR-T细胞上测定CD107a表达(图8B)。JEG-3细胞系仅表达与 β 2M缔合的HLA-G1同种型(图2C),以及LFTT-1CAR-T细胞能够裂解JEG-3肿瘤细胞(图8A)。仅在LFTT-1 CAR-T细胞上测定CD107a表达(图8B)。

[0532] 如图9所示,针对HLA-G阴性K562细胞系,对于LFTT-1和15E7 CAR-T细胞确定无IFN- γ 的分泌,而在与K562-HLA-G1P细胞系孵育后,两种CAR-T细胞均强烈分泌IFN- γ 。针对JEG-3细胞系,只有LFTT-1 CAR-T细胞分泌IFN- γ ,与JEG-3细胞裂解和LFTT-1CAR-T细胞上的CD107a细胞表面表达一致(图8)。

[0533] NGS小鼠的体内实验

[0534] 为了研究HLA-G CAR-T细胞在体内的功能,将表达萤光素酶的K562-HLA-G1P肿瘤细胞(K562-HLA-G1P-luc)植入NGS小鼠,然后接种HLA-G CAR-T细胞以监测针对HLA-G肿瘤细胞的HLA-GCAR-T细胞的细胞毒性(图10)。

[0535] 为此,如前所述产生活化的对照细胞和HLA-G CAR转导的T细胞。简而言之,将人T细胞分选、活化,然后用15E7-IgG4铰链-CAR或LFTT1-IgG4铰链-CAR构建体转导或不转导,并保持培养直至转导后第9天,以在体内实验之前返回到静息状态。

[0536] 然后,在静脉内接种K562-HLA-G1P-luc细胞之前24小时,对18只NGS雌性小鼠进行辐照。

[0537] 接种K562-HLA-G1细胞3天后,建立了每组6只小鼠的3个组,对应于:(i)6只小鼠接种1.106活化但未转导的人CD8 T细胞(对照组),(ii)6只小鼠接种1.106的15E7-IgG4-CAR-T细胞以及(iii)6只小鼠接种1.106的LFTT1-IgG4-CAR-T细胞。然后监测K562-HLA-G1P-luc肿瘤生长,以评估相对T细胞对照的HLA-G CAR T细胞的细胞毒性。

[0538] 材料与方法

[0539] 细胞系

[0540] Jurkat细胞系是购自ATCC(美国典型培养物保藏中心TIB-152)的人CD4⁺T细胞。分别用HLA-G1、HLA-G-LFTT-1或HLA-G-15E7CAR慢病毒转导Jurkat细胞系。在补充了2mM L-谷氨酰胺、1mg/ml青霉素和链霉素(Gibco)以及10%热灭活的FCS(Invitrogen)的RPMI 1640(Invitrogen)中培养Jurkat wt和Jurkat转导的细胞系。

[0541] NKT1.2是杂交瘤小鼠细胞系,由Kronenberg博士友情提供。它们还分别用HLA-G-LFTT-1或HLA-G-15E7 CAR慢病毒转导,并在补充有1mg/ml青霉素和链霉素(Gibco)的X-Vivo 10(Lonza)中培养。

[0542] K562细胞是购自ATCC(美国典型培养物保藏中心CCL-243)的人白血病细胞。通过用编码HLA-G1的载体对K562wt细胞进行核转染获得K562-HLA-G1p细胞,并通过编码HLA-G1的慢病毒转导获得K562-HLA-G1Lv细胞。这些细胞系在补充有2mM L-谷氨酰胺、1mg/ml青霉素和链霉素(Gibco)以及10%热灭活的FCS(Invitrogen)的RPMI 1640(Invitrogen)中培养。

[0543] Jeg-3细胞系是购自ATCC(美国典型培养物保藏中心HTB-36)的人绒毛癌组织。将它们在补充有1mg/ml青霉素和链霉素(X)和10%热灭活的FCS(Invitrogen)的MEM(X)中培养。

[0544] HLA-G CAR Jurkat细胞

[0545] 如先前所述[Pulè等人,2005Molecular Therapy]生成HLA-G-LFTT-1和HLA-G-15E7 CAR构建体。简而言之,抗HLA-G识别结构域是衍生自HLA-G1/缔合 β 2M特异性抗体LFTT-1或衍生自HLA-G1/无 β 2M特异性抗体15E7的单链可变片段(scFv)。使用衍生自IgG1铰链区的短间隔子将此scFv连接至跨膜结构域。HLA-GCAR胞内结构域由CD28、OX40和CD3 ζ 活

化分子的融合构成。在CMV立即早期启动子下,用特异性引物通过PCR提取后,通过消化/连接将CAR构建体克隆到pTrip质粒载体中。编码Mab的scFv轻链和重链的氨基酸序列在LFTT-1的SEQ ID NO:1(VH)、2(VL)和31(scFV)和在15E7的SEQ ID NO:3(VH)、4(VL)和30(scFV)中详细描述。CAR序列在15E7 CAR的SEQ ID NO:83和84(分别为氨基酸序列和核酸编码序列)以及LFTT-1 CAR的SEQ ID NO:85和86(分别为氨基酸序列和核酸编码序列)中公开。

[0546] HLA-G Jurkat细胞

[0547] 通过转导产生表达HLA-G的稳定Jurkat细胞系,并如下产生慢病毒颗粒:根据Zhao等人,将对应于天然HLA-G1 cDNA(NM_002127.5)修饰的K334A和K335A的特异性序列在CMV立即早期启动子下用特异性引物通过PCR提取后通过消化/连接分别克隆到pTrip质粒载体中。

[0548] 慢病毒载体

[0549] 通过用重组质粒pTRIP,编码来自VSV的糖蛋白、血清型印第安纳州糖蛋白的包膜表达质粒和p8.74衣壳化质粒磷酸钙共转染HEK-293T细胞(ATCC)来产生HIV-1衍生的载体颗粒。通过实时PCR对来自转导的HEK-293T细胞的细胞裂解物滴定病毒原液,并表示为每毫升转导单位(TU)。为了生成Jurkat HLA-G-LFTT-1、HLA-G-15E7 CAR细胞和Jurkat HLA-G,将 1×10^5 个Jurkat细胞接种在具有500 μ l的cRPMI培养基和分别 10^6 TU(293T)的Trip CMV-HLA-G-LFTT-1-CAR、Trip CMV-HLA-G-15E7-CAR或Trip CMV-HLA-G载体的12孔板中。将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,然后在37 $^{\circ}$ C 1200g下离心1小时。之后,加入1ml的cRPMI培养基并在37 $^{\circ}$ C下孵育。两周后,使用抗HLA-G抗体通过流式细胞术对阳性细胞进行分选。在Jurkat HLA-G-CAR活化测定之前,通过流式细胞术评估HLA-G的表达。进行相同的程序以获得K562 HLA-G1Lv和NKT1.2 HLA-G-LFTT-1 CAR或HLA-G-15E7 CAR细胞。

[0550] 流式细胞术

[0551] 来自eBiosciences(Paris;France)的PE缀合的小鼠IgG1(克隆P.3.6.8.2.1.12-4714)、来自BD Biosciences的FITC缀合的大鼠IgG2a(克隆:R35-95 553929,Le Pont de Claix;France)和MEM-G/09(Exbio,Praha)。进行流式细胞术,将相应的细胞系与单克隆抗体在室温下孵育1小时,洗涤两次,然后在室温下与PE缀合的山羊抗小鼠IgG抗体(405307,Biolegend,USA)一起孵育30分钟。流式细胞术分析使用LSR FORTRESSA(Beckton Dickinson,Le Pont-de-Claix,France)进行;使用FlowJo X软件(Tree star,Ashland,USA)分析数据。阳性标记群体的百分比定义为染色强度高于99%的同种型对照所显示的那些。

[0552] 活化测定

[0553] 根据制造商的说明书,分别用PKH26和PKH67荧光染料(Sigma)标记Jurkat HLA-G CAR效应细胞和Jurkat或Jurkat HLA-G1肿瘤细胞。

[0554] 对于基于胞吞作用(trogocytosis)原理的活化测定,将Jurkat HLA-G-LFTT-1或HLA-G-15E7 CAR(“获得”细胞)与Jurkat或Jurkat HLA-G1细胞(“供体”细胞)以1:1的效应-肿瘤比例以 2×10^6 个细胞/mL的总浓度和在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂湿润培养箱中共培养1h,如前所述[Caumartin J等人,(2007)Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells,EMBO J 26:1423-33]。共孵育结束时,将细胞置于冰上,所有其他步骤均在低于4 $^{\circ}$ C的温度下进行。通过流式细胞术研究了CAR效应细胞对肿瘤细胞膜的获取。

[0555] 载体产生

[0556] 通过用载体质粒pTRIP(编码来自VSV的糖蛋白,血清型印第安纳州(IND))和用于产生整合型慢病毒载体颗粒(ILV)的p8.74衣壳化质粒瞬时磷酸钙共转染HEK 293T细胞(ATCC)来产生HIV-1衍生的载体颗粒。如前所述(Coutant, F.等人, PLoS One, 2008.3(12): p.e3973),在转导293T细胞后,通过定量PCR确定载体基因转移能力,并表示为载体的转导单位(TU)/mL。

[0557] T细胞分离和活化

[0558] ficoll分离后,从3个不同健康供体(EFS, Rungis)的血液样品中提取PBMC。T细胞通过柱纯化(Miltenyi)进行分选,用CD3+CD28+包被的微珠(Miltenyi)活化,然后在37℃、5%CO₂下在补充了10%FCS 1%青霉素-链霉素(Gibco)、50μMβ-巯基乙醇(Gibco)、非必需氨基酸、10mM Hepes(Gibco)和1mM丙酮酸钠(Gibco)的RPMI 1640Glutamax(Gibco)中培养48小时。然后,洗涤细胞并用慢病毒载体以MOI 20以200μl以1M/ml在4小时内缓慢摇动下进行转导。然后将细胞转移至U型底96孔板中。24小时后,将细胞调节至1.10⁶个细胞/ml,并加入50U/ml的人IL2(Preprotech)。每2-3天对细胞计数,并在含有IL2的完全培养基中将其调整为1.10⁶个细胞/ml。8天后,将细胞用于功能测定。

[0559] 细胞毒性测定和活化特征谱

[0560] 针对JEG-3、K562和K562-HLA-G1靶细胞进行了细胞毒性测定。

[0561] 简而言之,在测定前24小时,用以1/10000的CFSE(CellTrace, Thermofisher)标记3.10⁵个JEG-3细胞;用以1/20000稀释的CFSE标记3.10⁵个K562或3.10⁵个K562-HLA-G1细胞。然后将靶细胞接种在U型底96孔板中。将CAR T细胞在PBS 1x(Gibco)中洗涤,然后以指定的效应:靶标比例(E:T)与靶细胞共培养。

[0562] 共孵育24小时后,收集培养基,并在0.1%的PBS-EDTA中回收细胞(在JEG-3情况下是分离的)。洗涤后,根据制造商的推荐,细胞用针对以下的抗体标记:CD4(克隆SK3 Percp, BD Pharmingen),CD8(克隆SK1 PE-Cy7, Biolegend),CD19(克隆LT19 FITC或PE, Miltenyi),CD25(克隆M-A251 BV421, BD Horizon),CD69(克隆FN50 BV711, BD Horizon),PD-1(克隆EH12.2H7 APC, Biolegend)和活/死(eFluor 780, Thermofisher)。用Attune细胞计数仪(Thermofisher)进行采集,并用FlowJo软件分析结果。

[0563] IFN γ 分泌测定

[0564] 按照制造商的说明,使用CBA试剂盒(BD Biosciences)在共培养培养基上直接进行IFN γ 定量。

[0565] 脱粒测定

[0566] 如前所述制备共培养的细胞(E:T比例为10),并将抗CD107a(克隆H4A3 PE, Biolegend)直接加入到共培养物中。共孵育1小时后,添加莫能菌素(GolgiStop, BD Bioscience)。共孵育实验后5小时回收细胞,并用CD4、CD8、CD19和活/死抗体标记。用Attune细胞计数仪进行采集,并用FlowJo软件分析结果。

[0567] 体内实验

[0568] 照射(2.5Gy)NOD/SCID/IL2R γ c缺陷(NSG)小鼠(6-8周龄, The Jackson laboratory, Sacramento, CA, USA),并用适当数量的表达荧光素酶的K562-HLA-G1P(1.10⁶/小鼠)肿瘤细胞进行静脉内接种。对于K562-HLA-G1P-Luc模型,在第3天在尾静脉中注射T细

胞(未转导和转导的)。每3至4天监测植入,直到植入后第17天,然后每周进行BLI测量:小鼠在成像(IVIS Lumina Series III,Perkin Elmer,Massachusetts,USA)前10分钟内接受腹膜内3mg萤光素(VivoGlo Luciferin,#P1043,Promega,Wisconsin,USA)。

[0569] 统计分析

[0570] 数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差(SD)。使用Student t检验,P值小于0.05被认为是显著的。对于显示代表性实验的图,误差线代表一式三份的SD。

[0571] 结论

[0572] 考虑到开发CAR免疫疗法的基本标准是适当的肿瘤相关抗原的鉴定、转基因效应细胞的可及性和免疫抑制肿瘤微环境的可逆性,似乎明显的是HLA-G代表了用于这一目的的非常有趣的候选物。HLA-G因其在免疫调节中的关键作用而被认为是ICP,还已广泛描述了该分子在多种起源的多种肿瘤积液表达,并且从未针对其描述细胞或体液反应。此外,HLA-G是单一分子,其功能已被表征,但其蛋白质结构却非常复杂且异质。因此,仅一种方法不足以抑制HLA-G功能。

[0573] 在此提出使用靶向针对大多数HLA-G同种型(经典HLA同种型和较小的无 β 2M的同种型)的分子的不同表位的抗HLA-G单克隆抗体(Mab)的scFv产生针对HLA-G的两种CAR。因此,预期消除大多数表达HLA-G免疫抑制同种型的细胞。产生了用根据本发明的核酸构建体转导的效应细胞,并且这些CAR分子在细胞表面高表达并且具有生物学功能。此外,产生了抗HLA-G CAR NKT细胞。先前已报道,与T或NK对应物相比,NKT细胞是更好的CAR治疗的免疫细胞。此外,显示出CAR NKT细胞以更高效率浸润实体瘤。由于实体瘤细胞高表达HLA-G(Paul等人,1999Cancer Research,Rouas-Freiss等人,2007Semin Cancer Biol,Yaghi等人,2016Oncotarget),抗HLA-G NKT CAR可能是一种创新的方法以规避与HLA-G相关的免疫抑制环境。

[0574] 总而言之,这里证明了根据本发明的第三代重组构建体CAR(i)在经转导的细胞的表面上正确表达,(ii)每个CAR:HLA-G-15E7 CAR和HLA-G-LFTT-1 CAR分别特异于无 β 2M的HLA-G或与 β 2M缔合的免疫抑制同种型,并且(iii)针对HLA-G的CAR表达效应细胞被正确活化。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 因维克蒂斯股份有限公司
[0003]	<120> 针对多种HLA-G同种型的嵌合抗原受体
[0004]	<130> PR2348EP00
[0005]	<160> 86
[0006]	<170> PatentIn version 3.5
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 122
[0009]	<212> PRT
[0010]	<213> 人工序列
[0011]	<220>
[0012]	<223> LFFT-1 VH
[0013]	<400> 1
[0014]	Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
[0015]	1 5 10 15
[0016]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
[0017]	20 25 30
[0018]	Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
[0019]	35 40 45
[0020]	Gly Trp Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Leu
[0021]	50 55 60
[0022]	Glu Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[0023]	65 70 75 80
[0024]	Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
[0025]	85 90 95
[0026]	Ala Arg Val Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[0027]	100 105 110
[0028]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Cys
[0029]	115 120
[0030]	<210> 2
[0031]	<211> 106
[0032]	<212> PRT
[0033]	<213> 人工
[0034]	<220>
[0035]	<223> LFFT-1 VL
[0036]	<400> 2
[0037]	Asp Ile His Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0038]	1 5 10 15
[0039]	Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
[0040]	20 25 30
[0041]	Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile

[0042]	35	40	45
[0043]	His Phe Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0044]	50	55	60
[0045]	Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro		
[0046]	65	70	75
[0047]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Arg Thr		
[0048]	85	90	95
[0049]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0050]	100	105	
[0051]	<210> 3		
[0052]	<211> 120		
[0053]	<212> PRT		
[0054]	<213> 人工序列		
[0055]	<220>		
[0056]	<223> 1E57 VH		
[0057]	<400> 3		
[0058]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser		
[0059]	1	5	10
[0060]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
[0061]	20	25	30
[0062]	Trp Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0063]	35	40	45
[0064]	Gly Thr Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr His Tyr Asn Gln Glu Phe		
[0065]	50	55	60
[0066]	Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0067]	65	70	75
[0068]	Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0069]	85	90	95
[0070]	Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
[0071]	100	105	110
[0072]	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
[0073]	115	120	
[0074]	<210> 4		
[0075]	<211> 113		
[0076]	<212> PRT		
[0077]	<213> 人工序列		
[0078]	<220>		
[0079]	<223> 1E57 VL		
[0080]	<400> 4		
[0081]	Asp Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu		
[0082]	1	5	10
[0083]	Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His		

[0084]	20	25	30
[0085]	Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
[0086]	35	40	45
[0087]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val		
[0088]	50	55	60
[0089]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
[0090]	65	70	75
[0091]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln		80
[0092]	85	90	95
[0093]	Gly Ser His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile		
[0094]	100	105	110
[0095]	Lys		
[0096]	<210> 5		
[0097]	<211> 8		
[0098]	<212> PRT		
[0099]	<213> 人工序列		
[0100]	<220>		
[0101]	<223> LFFT-1 VH CDR1		
[0102]	<400> 5		
[0103]	Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly		
[0104]	1	5	
[0105]	<210> 6		
[0106]	<211> 8		
[0107]	<212> PRT		
[0108]	<213> 人工序列		
[0109]	<220>		
[0110]	<223> LFFT-1 VH CDR2		
[0111]	<400> 6		
[0112]	Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Val Pro		
[0113]	1	5	
[0114]	<210> 7		
[0115]	<211> 14		
[0116]	<212> PRT		
[0117]	<213> 人工序列		
[0118]	<220>		
[0119]	<223> LFFT-1 VH CDR3		
[0120]	<400> 7		
[0121]	Ala Arg Val Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr		
[0122]	1	5	10
[0123]	<210> 8		
[0124]	<211> 6		
[0125]	<212> PRT		

[0126] <213> 人工序列
[0127] <220>
[0128] <223> LFFT-1 VL CDR1
[0129] <400> 8
[0130] Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
[0131] 1 5
[0132] <210> 9
[0133] <211> 3
[0134] <212> PRT
[0135] <213> 人工序列
[0136] <220>
[0137] <223> LFFT-1 VL CDR2
[0138] <400> 9
[0139] Phe Thr Ser
[0140] 1
[0141] <210> 10
[0142] <211> 8
[0143] <212> PRT
[0144] <213> 人工序列
[0145] <220>
[0146] <223> LFFT-1 VL CDR3
[0147] <400> 10
[0148] Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Arg Thr
[0149] 1 5
[0150] <210> 11
[0151] <211> 8
[0152] <212> PRT
[0153] <213> 人工序列
[0154] <220>
[0155] <223> 1E57 VH CDR1
[0156] <400> 11
[0157] Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp
[0158] 1 5
[0159] <210> 12
[0160] <211> 8
[0161] <212> PRT
[0162] <213> 人工序列
[0163] <220>
[0164] <223> 1E57 VH CDR2
[0165] <400> 12
[0166] Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr
[0167] 1 5

[0168]	<210>	13
[0169]	<211>	13
[0170]	<212>	PRT
[0171]	<213>	人工序列
[0172]	<220>	
[0173]	<223>	1E57 VH CDR3
[0174]	<400>	13
[0175]	Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr	
[0176]	1	5 10
[0177]	<210>	14
[0178]	<211>	11
[0179]	<212>	PRT
[0180]	<213>	人工序列
[0181]	<220>	
[0182]	<223>	1E57 VL CDR1
[0183]	<400>	14
[0184]	Gln Ser Ile Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr	
[0185]	1	5 10
[0186]	<210>	15
[0187]	<211>	3
[0188]	<212>	PRT
[0189]	<213>	人工序列
[0190]	<220>	
[0191]	<223>	1E57 VL CDR2
[0192]	<400>	15
[0193]	Lys Val Ser	
[0194]	1	
[0195]	<210>	16
[0196]	<211>	9
[0197]	<212>	PRT
[0198]	<213>	人工序列
[0199]	<220>	
[0200]	<223>	1E57 VL CDR3
[0201]	<400>	16
[0202]	Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Pro Thr	
[0203]	1	5
[0204]	<210>	17
[0205]	<211>	19
[0206]	<212>	PRT
[0207]	<213>	人工序列
[0208]	<220>	
[0209]	<223>	信号肽CD8a

[0210]	<400>	17														
[0211]	Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
[0212]	1				5					10					15	
[0213]	His	Ala	Ala													
[0214]	<210>	18														
[0215]	<211>	90														
[0216]	<212>	PRT														
[0217]	<213>	人工序列														
[0218]	<220>															
[0219]	<223>	CD8a铰链														
[0220]	<400>	18														
[0221]	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Met	Tyr	Phe	Ser	His	Phe	Val	Pro	Val	Phe
[0222]	1				5					10					15	
[0223]	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro
[0224]				20					25					30		
[0225]	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys
[0226]			35					40					45			
[0227]	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala
[0228]		50					55					60				
[0229]	Cys	Asp	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr
[0230]	65					70				75						80
[0231]	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile						
[0232]					85					90						
[0233]	<210>	19														
[0234]	<211>	64														
[0235]	<212>	PRT														
[0236]	<213>	人工序列														
[0237]	<220>															
[0238]	<223>	CD28铰链														
[0239]	<400>	19														
[0240]	Lys	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser
[0241]	1				5					10					15	
[0242]	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro
[0243]				20					25					30		
[0244]	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly
[0245]			35					40					45			
[0246]	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile
[0247]		50					55					60				
[0248]	<210>	20														
[0249]	<211>	68														
[0250]	<212>	PRT														
[0251]	<213>	人工序列														

[0252]	<220>
[0253]	<223> CD28人
[0254]	<400> 20
[0255]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
[0256]	1 5 10 15
[0257]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
[0258]	20 25 30
[0259]	Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
[0260]	35 40 45
[0261]	Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
[0262]	50 55 60
[0263]	Ala Tyr Arg Ser
[0264]	65
[0265]	<210> 21
[0266]	<211> 42
[0267]	<212> PRT
[0268]	<213> 人工序列
[0269]	<220>
[0270]	<223> 4-1BB人
[0271]	<400> 21
[0272]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
[0273]	1 5 10 15
[0274]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
[0275]	20 25 30
[0276]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[0277]	35 40
[0278]	<210> 22
[0279]	<211> 112
[0280]	<212> PRT
[0281]	<213> 人工序列
[0282]	<220>
[0283]	<223> CD3z 人胞内结构域
[0284]	<400> 22
[0285]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
[0286]	1 5 10 15
[0287]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
[0288]	20 25 30
[0289]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
[0290]	35 40 45
[0291]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
[0292]	50 55 60
[0293]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

[0294]	65	70	75	80
[0295]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
[0296]		85	90	95
[0297]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0298]		100	105	110
[0299]	<210> 23			
[0300]	<211> 24			
[0301]	<212> PRT			
[0302]	<213> 人工序列			
[0303]	<220>			
[0304]	<223> Flag Tag			
[0305]	<400> 23			
[0306]	Gly Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Gly Ala Cys Gly Ala Cys Gly			
[0307]	1	5	10	15
[0308]	Ala Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly			
[0309]		20		
[0310]	<210> 24			
[0311]	<211> 19			
[0312]	<212> PRT			
[0313]	<213> 人工序列			
[0314]	<220>			
[0315]	<223> 鼠IgKappa信号肽			
[0316]	<400> 24			
[0317]	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala			
[0318]	1	5	10	15
[0319]	Ser Ser Ser			
[0320]	<210> 25			
[0321]	<211> 12			
[0322]	<212> PRT			
[0323]	<213> 人工序列			
[0324]	<220>			
[0325]	<223> 铰链 hIgG4			
[0326]	<400> 25			
[0327]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro			
[0328]	1	5	10	
[0329]	<210> 26			
[0330]	<211> 109			
[0331]	<212> PRT			
[0332]	<213> 人工序列			
[0333]	<220>			
[0334]	<223> 突变的CH2 人IgG4			
[0335]	<400> 26			

[0336]	Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[0337]	1 5 10 15
[0338]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[0339]	20 25 30
[0340]	Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
[0341]	35 40 45
[0342]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[0343]	50 55 60
[0344]	Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
[0345]	65 70 75 80
[0346]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
[0347]	85 90 95
[0348]	Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
[0349]	100 105
[0350]	<210> 27
[0351]	<211> 107
[0352]	<212> PRT
[0353]	<213> 人工序列
[0354]	<220>
[0355]	<223> CH3 人IgG4
[0356]	<400> 27
[0357]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
[0358]	1 5 10 15
[0359]	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
[0360]	20 25 30
[0361]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[0362]	35 40 45
[0363]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[0364]	50 55 60
[0365]	Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
[0366]	65 70 75 80
[0367]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[0368]	85 90 95
[0369]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0370]	100 105
[0371]	<210> 28
[0372]	<211> 22
[0373]	<212> PRT
[0374]	<213> 人工序列
[0375]	<220>
[0376]	<223> P2A裂解肽
[0377]	<400> 28

[0378]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[0379]	1 5 10 15
[0380]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro
[0381]	20
[0382]	<210> 29
[0383]	<211> 313
[0384]	<212> PRT
[0385]	<213> 人工序列
[0386]	<220>
[0387]	<223> 截短的人CD19报告分子
[0388]	<400> 29
[0389]	Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
[0390]	1 5 10 15
[0391]	Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
[0392]	20 25 30
[0393]	Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
[0394]	35 40 45
[0395]	Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
[0396]	50 55 60
[0397]	Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
[0398]	65 70 75 80
[0399]	Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
[0400]	85 90 95
[0401]	Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
[0402]	100 105 110
[0403]	Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
[0404]	115 120 125
[0405]	Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
[0406]	130 135 140
[0407]	Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
[0408]	145 150 155 160
[0409]	Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
[0410]	165 170 175
[0411]	Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
[0412]	180 185 190
[0413]	Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
[0414]	195 200 205
[0415]	Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
[0416]	210 215 220
[0417]	Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
[0418]	225 230 235 240
[0419]	Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala

[0420]		245		250		255
[0421]	Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu					
[0422]		260		265		270
[0423]	Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly					
[0424]		275		280		285
[0425]	Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu					
[0426]		290		295		300
[0427]	Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu					
[0428]	305		310			
[0429]	<210> 30					
[0430]	<211> 247					
[0431]	<212> PRT					
[0432]	<213> 人工序列					
[0433]	<220>					
[0434]	<223> ScFV 15E7					
[0435]	<400> 30					
[0436]	Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly					
[0437]	1	5		10		15
[0438]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Arg					
[0439]		20		25		30
[0440]	Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser					
[0441]		35		40		45
[0442]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro					
[0443]		50		55		60
[0444]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile					
[0445]	65		70		75	80
[0446]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly					
[0447]		85		90		95
[0448]	Ser His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys					
[0449]		100		105		110
[0450]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln					
[0451]		115		120		125
[0452]	Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser					
[0453]		130		135		140
[0454]	Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp					
[0455]	145		150		155	160
[0456]	Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly					
[0457]		165		170		175
[0458]	Thr Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr His Tyr Asn Gln Glu Phe Lys					
[0459]		180		185		190
[0460]	Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met					
[0461]		195		200		205

[0462]	His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0463]	210 215 220
[0464]	Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0465]	225 230 235 240
[0466]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[0467]	245
[0468]	<210> 31
[0469]	<211> 242
[0470]	<212> PRT
[0471]	<213> 人工序列
[0472]	<220>
[0473]	<223> ScFV LFTT1
[0474]	<400> 31
[0475]	Asp Ile His Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0476]	1 5 10 15
[0477]	Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
[0478]	20 25 30
[0479]	Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
[0480]	35 40 45
[0481]	His Phe Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0482]	50 55 60
[0483]	Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
[0484]	65 70 75 80
[0485]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Arg Thr
[0486]	85 90 95
[0487]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[0488]	100 105 110
[0489]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser
[0490]	115 120 125
[0491]	Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys
[0492]	130 135 140
[0493]	Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Lys Gln
[0494]	145 150 155 160
[0495]	Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Tyr Thr Tyr Ser
[0496]	165 170 175
[0497]	Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Leu Glu Gly Arg Phe Ala Phe Ser
[0498]	180 185 190
[0499]	Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys
[0500]	195 200 205
[0501]	Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Arg Asp Gly Tyr
[0502]	210 215 220
[0503]	Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val

[0504]	225	230	235	240
[0505]	Ser Ser			
[0506]	<210> 32			
[0507]	<211> 1046			
[0508]	<212> PRT			
[0509]	<213> 人工序列			
[0510]	<220>			
[0511]	<223> LFTT1铰链CH2CH3 hIgG4			
[0512]	<400> 32			
[0513]	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala			
[0514]	1	5	10	15
[0515]	Ser Ser Ser Asp Ile His Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala			
[0516]		20	25	30
[0517]	Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile			
[0518]		35	40	45
[0519]	Asn Arg Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg			
[0520]		50	55	60
[0521]	Leu Leu Ile His Phe Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg			
[0522]	65	70	75	80
[0523]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn			
[0524]		85	90	95
[0525]	Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp			
[0526]		100	105	110
[0527]	Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly			
[0528]		115	120	125
[0529]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu			
[0530]		130	135	140
[0531]	Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile			
[0532]	145	150	155	160
[0533]	Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp			
[0534]		165	170	175
[0535]	Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Tyr			
[0536]		180	185	190
[0537]	Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Leu Glu Gly Arg Phe			
[0538]		195	200	205
[0539]	Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn			
[0540]		210	215	220
[0541]	Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Arg			
[0542]	225	230	235	240
[0543]	Asp Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser			
[0544]		245	250	255
[0545]	Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys			

[0546]	260	265	270
[0547]	Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
[0548]	275	280	285
[0549]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
[0550]	290	295	300
[0551]	Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr		
[0552]	305	310	315
[0553]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
[0554]	325	330	335
[0555]	Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
[0556]	340	345	350
[0557]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
[0558]	355	360	365
[0559]	Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
[0560]	370	375	380
[0561]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met		
[0562]	385	390	395
[0563]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
[0564]	405	410	415
[0565]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
[0566]	420	425	430
[0567]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
[0568]	435	440	445
[0569]	Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val		
[0570]	450	455	460
[0571]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
[0572]	465	470	475
[0573]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val		
[0574]	485	490	495
[0575]	Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile		
[0576]	500	505	510
[0577]	Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr		
[0578]	515	520	525
[0579]	Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln		
[0580]	530	535	540
[0581]	Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly		
[0582]	545	550	555
[0583]	Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val		
[0584]	565	570	575
[0585]	Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu		
[0586]	580	585	590
[0587]	Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		

[0588]	595	600	605
[0589]	Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		
[0590]	610	615	620
[0591]	Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		
[0592]	625	630	635
[0593]	Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		
[0594]	645	650	655
[0595]	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		
[0596]	660	665	670
[0597]	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu		
[0598]	675	680	685
[0599]	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His		
[0600]	690	695	700
[0601]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu		
[0602]	705	710	715
[0603]	Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Pro Pro		
[0604]	725	730	735
[0605]	Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met Glu Val Arg		
[0606]	740	745	750
[0607]	Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val		
[0608]	755	760	765
[0609]	Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr		
[0610]	770	775	780
[0611]	Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly		
[0612]	785	790	795
[0613]	Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe		
[0614]	805	810	815
[0615]	Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro		
[0616]	820	825	830
[0617]	Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val		
[0618]	835	840	845
[0619]	Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly		
[0620]	850	855	860
[0621]	Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro		
[0622]	865	870	875
[0623]	Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg		
[0624]	885	890	895
[0625]	Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser		
[0626]	900	905	910
[0627]	Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr		
[0628]	915	920	925
[0629]	Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro		

[0630]	930	935	940
[0631]	Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser		
[0632]	945	950	955 960
[0633]	Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu		
[0634]	965	970	975
[0635]	Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr		
[0636]	980	985	990
[0637]	Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr		
[0638]	995	1000	1005
[0639]	Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp		
[0640]	1010	1015	1020
[0641]	Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu Cys		
[0642]	1025	1030	1035
[0643]	Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu		
[0644]	1040	1045	
[0645]	<210> 33		
[0646]	<211> 937		
[0647]	<212> PRT		
[0648]	<213> 人工序列		
[0649]	<220>		
[0650]	<223> LFTT1 CH3 hIgG4		
[0651]	<400> 33		
[0652]	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala		
[0653]	1 5 10 15		
[0654]	Ser Ser Ser Asp Ile His Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala		
[0655]	20 25 30		
[0656]	Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile		
[0657]	35 40 45		
[0658]	Asn Arg Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg		
[0659]	50 55 60		
[0660]	Leu Leu Ile His Phe Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg		
[0661]	65 70 75 80		
[0662]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn		
[0663]	85 90 95		
[0664]	Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp		
[0665]	100 105 110		
[0666]	Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly		
[0667]	115 120 125		
[0668]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu		
[0669]	130 135 140		
[0670]	Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile		
[0671]	145 150 155 160		

[0672]	Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp		
[0673]		165	170
[0674]	Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Tyr		175
[0675]		180	185
[0676]	Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Leu Glu Gly Arg Phe		190
[0677]		195	200
[0678]	Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn		205
[0679]		210	215
[0680]	Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Arg		220
[0681]		225	230
[0682]	Asp Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser		235
[0683]		245	250
[0684]	Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys		255
[0685]		260	265
[0686]	Pro Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		270
[0687]		275	280
[0688]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		285
[0689]		290	295
[0690]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		300
[0691]		305	310
[0692]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		315
[0693]		325	330
[0694]	Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		320
[0695]		340	345
[0696]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		350
[0697]		355	360
[0698]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp Val Leu		365
[0699]		370	375
[0700]	Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val		380
[0701]		385	390
[0702]	Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His		395
[0703]		405	410
[0704]	Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys		415
[0705]		420	425
[0706]	His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser		430
[0707]		435	440
[0708]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met		445
[0709]		450	455
[0710]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		460
[0711]		465	470
[0712]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg		475
[0713]		485	490

[0714]	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn		
[0715]	500	505	510
[0716]	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg		
[0717]	515	520	525
[0718]	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro		
[0719]	530	535	540
[0720]	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala		
[0721]	545	550	555
[0722]	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His		
[0723]	565	570	575
[0724]	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp		
[0725]	580	585	590
[0726]	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn		
[0727]	595	600	605
[0728]	Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro		
[0729]	610	615	620
[0730]	Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met		
[0731]	625	630	635
[0732]	Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp		
[0733]	645	650	655
[0734]	Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln		
[0735]	660	665	670
[0736]	Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu		
[0737]	675	680	685
[0738]	Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile		
[0739]	690	695	700
[0740]	Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu		
[0741]	705	710	715
[0742]	Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr		
[0743]	725	730	735
[0744]	Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp		
[0745]	740	745	750
[0746]	Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro		
[0747]	755	760	765
[0748]	Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala		
[0749]	770	775	780
[0750]	Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro		
[0751]	785	790	795
[0752]	Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro		
[0753]	805	810	815
[0754]	Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser		
[0755]	820	825	830

[0756]	Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
[0757]	835 840 845
[0758]	Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
[0759]	850 855 860
[0760]	Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
[0761]	865 870 875 880
[0762]	Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
[0763]	885 890 895
[0764]	Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
[0765]	900 905 910
[0766]	Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
[0767]	915 920 925
[0768]	Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu
[0769]	930 935
[0770]	<210> 34
[0771]	<211> 830
[0772]	<212> PRT
[0773]	<213> 人工序列
[0774]	<220>
[0775]	<223> LFTT1 hIgG4
[0776]	<400> 34
[0777]	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
[0778]	1 5 10 15
[0779]	Ser Ser Ser Asp Ile His Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
[0780]	20 25 30
[0781]	Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile
[0782]	35 40 45
[0783]	Asn Arg Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg
[0784]	50 55 60
[0785]	Leu Leu Ile His Phe Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg
[0786]	65 70 75 80
[0787]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn
[0788]	85 90 95
[0789]	Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp
[0790]	100 105 110
[0791]	Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
[0792]	115 120 125
[0793]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu
[0794]	130 135 140
[0795]	Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile
[0796]	145 150 155 160
[0797]	Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp

[0798]	165							170							175								
[0799]	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Tyr							
[0800]	180							185							190								
[0801]	Thr	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Leu	Glu	Gly	Arg	Phe							
[0802]	195							200							205								
[0803]	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn							
[0804]	210							215							220								
[0805]	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Val	Arg							
[0806]	225							230							235							240	
[0807]	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser							
[0808]	245							250							255								
[0809]	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys							
[0810]	260							265							270								
[0811]	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser							
[0812]	275							280							285								
[0813]	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg							
[0814]	290							295							300								
[0815]	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro							
[0816]	305							310							315							320	
[0817]	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe							
[0818]	325							330							335								
[0819]	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe							
[0820]	340							345							350								
[0821]	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly							
[0822]	355							360							365								
[0823]	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg							
[0824]	370							375							380								
[0825]	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln							
[0826]	385							390							395							400	
[0827]	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp							
[0828]	405							410							415								
[0829]	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro							
[0830]	420							425							430								
[0831]	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp							
[0832]	435							440							445								
[0833]	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg							
[0834]	450							455							460								
[0835]	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr							
[0836]	465							470							475							480	
[0837]	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Gly							
[0838]	485							490							495								
[0839]	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Gln							

[0840]	500	505	510
[0841]	Glu Asn Pro Gly Pro Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu		
[0842]	515	520	525
[0843]	Phe Leu Thr Pro Met Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys		
[0844]	530	535	540
[0845]	Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser		
[0846]	545	550	555
[0847]	Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys		
[0848]	565	570	575
[0849]	Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met		
[0850]	580	585	590
[0851]	Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met		
[0852]	595	600	605
[0853]	Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp		
[0854]	610	615	620
[0855]	Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg		
[0856]	625	630	635
[0857]	Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg		
[0858]	645	650	655
[0859]	Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys		
[0860]	660	665	670
[0861]	Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro		
[0862]	675	680	685
[0863]	Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp		
[0864]	690	695	700
[0865]	Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro		
[0866]	705	710	715
[0867]	Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro		
[0868]	725	730	735
[0869]	Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro		
[0870]	740	745	750
[0871]	Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala		
[0872]	755	760	765
[0873]	Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr		
[0874]	770	775	780
[0875]	Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp		
[0876]	785	790	795
[0877]	Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr		
[0878]	805	810	815
[0879]	Leu Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu		
[0880]	820	825	830
[0881]	<210> 35		

[0882]	<211>	1051
[0883]	<212>	PRT
[0884]	<213>	人工序列
[0885]	<220>	
[0886]	<223>	15E7 CH2CH3 hIgG4
[0887]	<400>	35
[0888]	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
[0889]	1	5 10 15
[0890]	Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Phe Ser Leu Pro Val	
[0891]		20 25 30
[0892]	Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile	
[0893]		35 40 45
[0894]	Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
[0895]		50 55 60
[0896]	Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
[0897]	65	70 75 80
[0898]	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
[0899]		85 90 95
[0900]	Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys	
[0901]		100 105 110
[0902]	Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu	
[0903]		115 120 125
[0904]	Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
[0905]		130 135 140
[0906]	Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro	
[0907]	145	150 155 160
[0908]	Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	
[0909]		165 170 175
[0910]	Asp Tyr Trp Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu	
[0911]		180 185 190
[0912]	Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr His Tyr Asn Gln	
[0913]		195 200 205
[0914]	Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr	
[0915]		210 215 220
[0916]	Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr	
[0917]	225	230 235 240
[0918]	Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp	
[0919]		245 250 255
[0920]	Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro	
[0921]		260 265 270
[0922]	Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe	
[0923]		275 280 285

[0924]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
[0925]	290	295	300
[0926]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val		
[0927]	305	310	315 320
[0928]	Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
[0929]	325	330	335
[0930]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
[0931]	340	345	350
[0932]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
[0933]	355	360	365
[0934]	Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
[0935]	370	375	380
[0936]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
[0937]	385	390	395 400
[0938]	Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
[0939]	405	410	415
[0940]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
[0941]	420	425	430
[0942]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
[0943]	435	440	445
[0944]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
[0945]	450	455	460
[0946]	Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
[0947]	465	470	475 480
[0948]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp		
[0949]	485	490	495
[0950]	Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val		
[0951]	500	505	510
[0952]	Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu		
[0953]	515	520	525
[0954]	Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr		
[0955]	530	535	540
[0956]	Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr		
[0957]	545	550	555 560
[0958]	Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro		
[0959]	565	570	575
[0960]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys		
[0961]	580	585	590
[0962]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe		
[0963]	595	600	605
[0964]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
[0965]	610	615	620

[0966]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
[0967]	625 630 635 640
[0968]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
[0969]	645 650 655
[0970]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
[0971]	660 665 670
[0972]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
[0973]	675 680 685
[0974]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
[0975]	690 695 700
[0976]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala
[0977]	705 710 715 720
[0978]	Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
[0979]	725 730 735
[0980]	Gly Pro Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr
[0981]	740 745 750
[0982]	Pro Met Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu
[0983]	755 760 765
[0984]	Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro
[0985]	770 775 780
[0986]	Thr Gln Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu
[0987]	785 790 795 800
[0988]	Lys Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu
[0989]	805 810 815
[0990]	Ala Ile Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe
[0991]	820 825 830
[0992]	Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly
[0993]	835 840 845
[0994]	Trp Thr Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val
[0995]	850 855 860
[0996]	Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu
[0997]	865 870 875 880
[0998]	Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val
[0999]	885 890 895
[1000]	Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu
[1001]	900 905 910
[1002]	Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met
[1003]	915 920 925
[1004]	Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser
[1005]	930 935 940
[1006]	Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro
[1007]	945 950 955 960

[1008]	Lys Ser Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp
[1009]	965 970 975
[1010]	Met Trp Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln
[1011]	980 985 990
[1012]	Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe
[1013]	995 1000 1005
[1014]	His Leu Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu
[1015]	1010 1015 1020
[1016]	Arg Thr Gly Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu
[1017]	1025 1030 1035
[1018]	Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu
[1019]	1040 1045 1050
[1020]	<210> 36
[1021]	<211> 942
[1022]	<212> PRT
[1023]	<213> 人工序列
[1024]	<220>
[1025]	<223> 15E7 CH3 hIgG4
[1026]	<400> 36
[1027]	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
[1028]	1 5 10 15
[1029]	Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Phe Ser Leu Pro Val
[1030]	20 25 30
[1031]	Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
[1032]	35 40 45
[1033]	Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
[1034]	50 55 60
[1035]	Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
[1036]	65 70 75 80
[1037]	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[1038]	85 90 95
[1039]	Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
[1040]	100 105 110
[1041]	Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu
[1042]	115 120 125
[1043]	Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[1044]	130 135 140
[1045]	Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
[1046]	145 150 155 160
[1047]	Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
[1048]	165 170 175
[1049]	Asp Tyr Trp Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

[1050]	180					185					190						
[1051]	Trp	Ile	Gly	Thr	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ser	Ser	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	
[1052]	195					200					205						
[1053]	Glu	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	
[1054]	210					215					220						
[1055]	Ala	Tyr	Met	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	
[1056]	225					230					235					240	
[1057]	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Leu	Ala	Gly	Val	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	
[1058]	245					250					255						
[1059]	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	
[1060]	260					265					270						
[1061]	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
[1062]	275					280					285						
[1063]	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
[1064]	290					295					300						
[1065]	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
[1066]	305					310					315					320	
[1067]	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
[1068]	325					330					335						
[1069]	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
[1070]	340					345					350						
[1071]	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
[1072]	355					360					365						
[1073]	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	
[1074]	370					375					380						
[1075]	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	
[1076]	385					390					395					400	
[1077]	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	
[1078]	405					410					415						
[1079]	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	
[1080]	420					425					430						
[1081]	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	
[1082]	435					440					445						
[1083]	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	
[1084]	450					455					460						
[1085]	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	
[1086]	465					470					475					480	
[1087]	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	
[1088]	485					490					495						
[1089]	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	
[1090]	500					505					510						
[1091]	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asn	

[1092]	515	520	525
[1093]	Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro		
[1094]	530	535	540
[1095]	Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp		
[1096]	545	550	555
[1097]	Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg		
[1098]	565	570	575
[1099]	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr		
[1100]	580	585	590
[1101]	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly		
[1102]	595	600	605
[1103]	Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu		
[1104]	610	615	620
[1105]	Glu Asn Pro Gly Pro Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu		
[1106]	625	630	635
[1107]	Phe Leu Thr Pro Met Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys		
[1108]	645	650	655
[1109]	Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser		
[1110]	660	665	670
[1111]	Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys		
[1112]	675	680	685
[1113]	Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met		
[1114]	690	695	700
[1115]	Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met		
[1116]	705	710	715
[1117]	Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp		
[1118]	725	730	735
[1119]	Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg		
[1120]	740	745	750
[1121]	Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg		
[1122]	755	760	765
[1123]	Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys		
[1124]	770	775	780
[1125]	Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro		
[1126]	785	790	795
[1127]	Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp		
[1128]	805	810	815
[1129]	Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro		
[1130]	820	825	830
[1131]	Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro		
[1132]	835	840	845
[1133]	Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro		

[1134]	850	855	860
[1135]	Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala		
[1136]	865	870	875 880
[1137]	Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr		
[1138]	885	890	895
[1139]	Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp		
[1140]	900	905	910
[1141]	Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr		
[1142]	915	920	925
[1143]	Leu Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu		
[1144]	930	935	940
[1145]	<210> 37		
[1146]	<211> 835		
[1147]	<212> PRT		
[1148]	<213> 人工序列		
[1149]	<220>		
[1150]	<223> 15E7 hIgG4		
[1151]	<400> 37		
[1152]	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala		
[1153]	1 5 10 15		
[1154]	Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Phe Ser Leu Pro Val		
[1155]	20 25 30		
[1156]	Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile		
[1157]	35 40 45		
[1158]	Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro		
[1159]	50 55 60		
[1160]	Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser		
[1161]	65 70 75 80		
[1162]	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
[1163]	85 90 95		
[1164]	Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys		
[1165]	100 105 110		
[1166]	Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu		
[1167]	115 120 125		
[1168]	Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[1169]	130 135 140		
[1170]	Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro		
[1171]	145 150 155 160		
[1172]	Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr		
[1173]	165 170 175		
[1174]	Asp Tyr Trp Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu		
[1175]	180 185 190		

[1176]	Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr His Tyr Asn Gln		
[1177]	195	200	205
[1178]	Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr		
[1179]	210	215	220
[1180]	Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr		
[1181]	225	230	235 240
[1182]	Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp		
[1183]	245	250	255
[1184]	Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
[1185]	260	265	270
[1186]	Pro Cys Pro Pro Cys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val		
[1187]	275	280	285
[1188]	Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp		
[1189]	290	295	300
[1190]	Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met		
[1191]	305	310	315 320
[1192]	Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala		
[1193]	325	330	335
[1194]	Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys		
[1195]	340	345	350
[1196]	Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr		
[1197]	355	360	365
[1198]	Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly		
[1199]	370	375	380
[1200]	Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala		
[1201]	385	390	395 400
[1202]	Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg		
[1203]	405	410	415
[1204]	Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu		
[1205]	420	425	430
[1206]	Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		
[1207]	435	440	445
[1208]	Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
[1209]	450	455	460
[1210]	Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		
[1211]	465	470	475 480
[1212]	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
[1213]	485	490	495
[1214]	Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln		
[1215]	500	505	510
[1216]	Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Pro Pro Pro Arg Leu		
[1217]	515	520	525

[1218]	Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met Glu Val Arg Pro Glu Glu
[1219]	530 535 540
[1220]	Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys
[1221]	545 550 555 560
[1222]	Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp Ser Arg
[1223]	565 570 575
[1224]	Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly
[1225]	580 585 590
[1226]	Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile Phe Asn
[1227]	595 600 605
[1228]	Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Pro Pro
[1229]	610 615 620
[1230]	Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu Gly Ser
[1231]	625 630 635 640
[1232]	Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys
[1233]	645 650 655
[1234]	Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys
[1235]	660 665 670
[1236]	Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Ile
[1237]	675 680 685
[1238]	Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln
[1239]	690 695 700
[1240]	Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu
[1241]	705 710 715 720
[1242]	Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp
[1243]	725 730 735
[1244]	Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser Leu Glu Leu
[1245]	740 745 750
[1246]	Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu Thr Gly Leu
[1247]	755 760 765
[1248]	Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys His
[1249]	770 775 780
[1250]	Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr Ala Arg Pro
[1251]	785 790 795 800
[1252]	Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys Val Ser Ala
[1253]	805 810 815
[1254]	Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu Val Gly Ile
[1255]	820 825 830
[1256]	Leu His Leu
[1257]	835
[1258]	<210> 38
[1259]	<211> 366

[1260]	<212>	DNA	
[1261]	<213>	人工序列	
[1262]	<220>		
[1263]	<223>	LFET-1 VH	
[1264]	<400>	38	
[1265]		cagattcagc ttgtacaatc tgggcctgag ctgaagaaac ccggagaaac cgtcaagatc	60
[1266]		agctgcaaag caagtgggta tactttcacg acgtatggca tgtcttgggt caagcaagct	120
[1267]		cctgggaaag ggctgaaatg gatgggctgg atttacacct attctggagt tctacatat	180
[1268]		gccgacgac tggaagggcg ctttgccttc agcctggaga ctagcgcctc aaccgcttat	240
[1269]		ttgcagatca acaacctcaa gaacgaagat acggcgacct atttctgtgc cagagttcgg	300
[1270]		gatggctact atagatacgc catggattat tggggccaag gtacatccgt gaccgtttca	360
[1271]		agctgc	366
[1272]	<210>	39	
[1273]	<211>	318	
[1274]	<212>	DNA	
[1275]	<213>	人工序列	
[1276]	<220>		
[1277]	<223>	LFET-1 VL	
[1278]	<400>	39	
[1279]		gatatccata tgaccagag tccaagctct ctgagcgcta gcctgggagg caaagtgacc	60
[1280]		ataacatgca aggtatgcca ggacattaac cgtggtacca gcataagccc	120
[1281]		ggaaaaggcc ccagactgct gatccacttc acctccacac tgcagtccgg gattccctca	180
[1282]		cgattctccg gatcagggtc aggtcgagac tactccttta gcatttccaa cctcgaaact	240
[1283]		gaggacatcg ccacatacta ctgtctgcag tatgacgacc ttgcacttt tggcggtgga	300
[1284]		actaaactgg agatcaag	318
[1285]	<210>	40	
[1286]	<211>	360	
[1287]	<212>	DNA	
[1288]	<213>	人工序列	
[1289]	<220>		
[1290]	<223>	1E57 VH	
[1291]	<400>	40	
[1292]		cagggtcagt tgcagcaacc cggggccgaa ctggctcagc cgggctcttc tgtgaagctg	60
[1293]		tcatgcaagg ctagtggtta taccttcacc gactattgga tggattgggt aaagcagcgg	120
[1294]		ccaggacaag gactggaatg gattgggacc atttacccca gcgacagttc tacgcactac	180
[1295]		aatcaggagt tcaaaggcaa ggctacaatg acagtggaca agtccagttc tacagcctac	240
[1296]		atgcaccttt ctagcctcac atcagaggat tccgcagtgt actattgtgc acgtgaaggc	300
[1297]		ctggctggag tgttttactt cgactactgg ggacagggga ccaccttgac ggtagctcc	360
[1298]	<210>	41	
[1299]	<211>	339	
[1300]	<212>	DNA	
[1301]	<213>	人工序列	

[1302]	<220>	
[1303]	<223>	1E57 VL
[1304]	<400>	41
[1305]	gacgatgtcc tgatgacaca aatcccatTT agcctgcctg tatccctggg tgatcaggcc	60
[1306]	agcattagct gtcgctcctc ccagtcctac gtTaccggT ctggcaacac gtatctggaa	120
[1307]	tggtacctcc agaaaccCGG ccaatccctT aagctcctta ttTaaaaagt gagcaatcgc	180
[1308]	ttttctggag Tgcctgatag attctcagga agTggTtcag gaactgactt cacccttaag	240
[1309]	attagccggg ttgaggccga ggatcttggt gtgtactact gctttcaagg gagtcacctt	300
[1310]	cctcccatcT ttggcgGcgG cacaactctg gagatcaaa	339
[1311]	<210>	42
[1312]	<211>	24
[1313]	<212>	DNA
[1314]	<213>	人工序列
[1315]	<220>	
[1316]	<223>	LFIT-1 VH CDR1
[1317]	<400>	42
[1318]	gggtatactt tcacgacgta tggc	24
[1319]	<210>	43
[1320]	<211>	24
[1321]	<212>	DNA
[1322]	<213>	人工序列
[1323]	<220>	
[1324]	<223>	LFIT-1 VH CDR2
[1325]	<400>	43
[1326]	atttacacct attctggagt tcct	24
[1327]	<210>	44
[1328]	<211>	42
[1329]	<212>	DNA
[1330]	<213>	人工序列
[1331]	<220>	
[1332]	<223>	LFIT-1 VH CDR3
[1333]	<400>	44
[1334]	gccagagttc gggatggcta ctatagatac gccatggatt at	42
[1335]	<210>	45
[1336]	<211>	18
[1337]	<212>	DNA
[1338]	<213>	人工序列
[1339]	<220>	
[1340]	<223>	LFIT-1 VL CDR1
[1341]	<400>	45
[1342]	caggacatta accggtac	18
[1343]	<210>	46

[1344]	<211>	9	
[1345]	<212>	DNA	
[1346]	<213>	人工序列	
[1347]	<220>		
[1348]	<223>	LFIT-1 VL CDR2	
[1349]	<400>	46	
[1350]		ttcacctcc	9
[1351]	<210>	47	
[1352]	<211>	24	
[1353]	<212>	DNA	
[1354]	<213>	人工序列	
[1355]	<220>		
[1356]	<223>	LFIT-1 VL CDR3	
[1357]	<400>	47	
[1358]		ctgcagtatg acgaccttcg cact	24
[1359]	<210>	48	
[1360]	<211>	24	
[1361]	<212>	DNA	
[1362]	<213>	人工序列	
[1363]	<220>		
[1364]	<223>	1E57 VH CDR1	
[1365]	<400>	48	
[1366]		ggctataacct tcaccgacta ttgg	24
[1367]	<210>	49	
[1368]	<211>	24	
[1369]	<212>	DNA	
[1370]	<213>	人工序列	
[1371]	<220>		
[1372]	<223>	1E57 VH CDR2	
[1373]	<400>	49	
[1374]		atttacccca gcgacagttc tacg	24
[1375]	<210>	50	
[1376]	<211>	39	
[1377]	<212>	DNA	
[1378]	<213>	人工序列	
[1379]	<220>		
[1380]	<223>	1E57 VH CDR3	
[1381]	<400>	50	
[1382]		gcacgtgaag gcctggctgg agtggttttac ttcgactac	39
[1383]	<210>	51	
[1384]	<211>	33	
[1385]	<212>	DNA	

[1386]	<213>	人工序列	
[1387]	<220>		
[1388]	<223>	1E57 VL CDR1	
[1389]	<400>	51	
[1390]		cagtccatcg ttcaccggtc tggcaacacg tat	33
[1391]	<210>	52	
[1392]	<211>	9	
[1393]	<212>	DNA	
[1394]	<213>	人工序列	
[1395]	<220>		
[1396]	<223>	1E57 VL CDR2	
[1397]	<400>	52	
[1398]		aaagtgagc	9
[1399]	<210>	53	
[1400]	<211>	27	
[1401]	<212>	DNA	
[1402]	<213>	人工序列	
[1403]	<220>		
[1404]	<223>	1E57 VL CDR3	
[1405]	<400>	53	
[1406]		tttcaaggga gtcaccttcc tcccaca	27
[1407]	<210>	54	
[1408]	<211>	57	
[1409]	<212>	DNA	
[1410]	<213>	人工序列	
[1411]	<220>		
[1412]	<223>	信号肽CD8a	
[1413]	<400>	54	
[1414]		atggetctcc ctgtaaccgc actccttctg ccattggetc tectgettca tgecgcc	57
[1415]	<210>	55	
[1416]	<211>	270	
[1417]	<212>	DNA	
[1418]	<213>	人工序列	
[1419]	<220>		
[1420]	<223>	CD8a铰链	
[1421]	<400>	55	
[1422]		gccctgtcca acagcattat gtacttctca catttcgttc ctgtgtttct gcccgcaaaa	60
[1423]		cctactacaa cccctgcccc tegaccacca actccagctc ccactatagc ctctcagccc	120
[1424]		ctgtctctca gaccagaggc ctgtaggcct gctgcgggag gagccgtgca taccgcgggg	180
[1425]		ttggacttcg cctgcgattt ctgggtgctg gttgtagtag gcggagtctt ggcctgttat	240
[1426]		tcactgttgg ttacagtggc ctttatcata	270
[1427]	<210>	56	

[1428]	<211>	192	
[1429]	<212>	DNA	
[1430]	<213>	人工序列	
[1431]	<220>		
[1432]	<223>	CD28铰链	
[1433]	<400>	56	
[1434]	aagatcgaag tgatgtaccc tcttcctat ctcgacaatg agaaatccaa tggaaccatt	60	
[1435]	atacacgtca aggggaagca cctgtgtccc agccctctgt ttccgggacc ctctaaacca	120	
[1436]	ttttgggtgc tgggtgggtggt aggaggagtt ctcgcgtgct atagcctggt ggtgactgtc	180	
[1437]	gcattcatca tc	192	
[1438]	<210>	57	
[1439]	<211>	204	
[1440]	<212>	DNA	
[1441]	<213>	人工序列	
[1442]	<220>		
[1443]	<223>	CD28人	
[1444]	<400>	57	
[1445]	ttttgggtgc tgggtgggtggt gggaggcgtg ctggcctggt attctctgct ggtgaccgtg	60	
[1446]	gccttcatca tcttttgggt gcgcagcaag cggagccggtc tgctgcactc cgactacatg	120	
[1447]	aacatgaccc caagacggcc cggaccaaca aggaagcact accagcctta tgcaccaccc	180	
[1448]	cgcgattttg cagcataaccg gaggc	204	
[1449]	<210>	58	
[1450]	<211>	126	
[1451]	<212>	DNA	
[1452]	<213>	人工序列	
[1453]	<220>		
[1454]	<223>	4-1BB人	
[1455]	<400>	58	
[1456]	aagagaggca ggaagaagct gctgtatatc ttcaagcagc ctttcatgcg gcccgatgcg	60	
[1457]	accacacagg aggaggacgg ctgctcctgt aggttccctg aagaggagga gggaggatgc	120	
[1458]	gagctg	126	
[1459]	<210>	59	
[1460]	<211>	336	
[1461]	<212>	DNA	
[1462]	<213>	人工序列	
[1463]	<220>		
[1464]	<223>	CD3z 人胞内结构域	
[1465]	<400>	59	
[1466]	agagtgaagt tttctaggag cgccgatgca ccagcatacc agcagggaca gaatcagctg	60	
[1467]	tataacgagc tgaatctggg caggcgcgag gactacgacg tgctggataa gaggagagga	120	
[1468]	cgggaccccg agatgggagg caagccaagg cgcaagaacc cccaggaggg cctgtacaat	180	
[1469]	gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc tatagcgaga tcggcatgaa gggagagcgg	240	

[1470]	agaaggggca agggacacga tggcctgtac cagggcctgt ccaccgccac aaaggacacc	300
[1471]	tatgatgccc tgcacatgca ggccctgcct ccaagg	336
[1472]	<210> 60	
[1473]	<211> 24	
[1474]	<212> DNA	
[1475]	<213> 人工序列	
[1476]	<220>	
[1477]	<223> Flag Tag	
[1478]	<400> 60	
[1479]	gattacaagg atgacgacga caaa	24
[1480]	<210> 61	
[1481]	<211> 57	
[1482]	<212> DNA	
[1483]	<213> 人工序列	
[1484]	<220>	
[1485]	<223> 鼠IgKappa信号肽	
[1486]	<400> 61	
[1487]	atgaaactgc ccgtgagact gctggtgctg atgttttggga ttcccgttc ctcgagc	57
[1488]	<210> 62	
[1489]	<211> 36	
[1490]	<212> DNA	
[1491]	<213> 人工序列	
[1492]	<220>	
[1493]	<223> 铰链 hIgG4	
[1494]	<400> 62	
[1495]	gagagcaagt acggcccacc ctgccctcca tgtcca	36
[1496]	<210> 63	
[1497]	<211> 327	
[1498]	<212> DNA	
[1499]	<213> 人工序列	
[1500]	<220>	
[1501]	<223> 突变的CH2 人IgG4	
[1502]	<400> 63	
[1503]	gcaccacctg tggcaggacc ttccgtgttc ctgtttccac ccaagcctaa ggacacactg	60
[1504]	atgatctccc ggaccccaga ggtgacatgc gtggtggtgg acgtgtctca ggaggacccc	120
[1505]	gaggtgcagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc acaatgcaa gaccaagccc	180
[1506]	cgcgaggagc agtttcagtc cacctaccgg gtggtgtctg tgctgacagt gctgcaccag	240
[1507]	gactggctga acggcaagga gtataagtgc aaggtgagca ataagggcct gccttctct	300
[1508]	atcgagaaga ccattctcaa ggccaag	327
[1509]	<210> 64	
[1510]	<211> 321	
[1511]	<212> DNA	

[1512]	<213>	人工序列	
[1513]	<220>		
[1514]	<223>	CH3 人IgG4	
[1515]	<400>	64	
[1516]		ggccagccca gagagcctca ggtgtacaca ctgcctccat ctcaggagga gatgaccaag	60
[1517]		aaccaggtga gcctgacatg tctggtgaag ggctttctatc catccgacat cgccgtggag	120
[1518]		tgggagtcta atggccagcc cgagaacaat tacaagacca caccctgt gctggactcc	180
[1519]		gatggctctt tctttctgta ttctcgctg accgtggata agagccggtg gcaggagggc	240
[1520]		aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca atcactacac acagaagtct	300
[1521]		ctgagcctgt ccctgggcaa g	321
[1522]	<210>	65	
[1523]	<211>	57	
[1524]	<212>	DNA	
[1525]	<213>	人工序列	
[1526]	<220>		
[1527]	<223>	P2A裂解肽	
[1528]	<400>	65	
[1529]		gccacaaact tctccctgct gaagcaggcc ggcgatgtgg aggagaatcc tggacca	57
[1530]	<210>	66	
[1531]	<211>	939	
[1532]	<212>	DNA	
[1533]	<213>	人工序列	
[1534]	<220>		
[1535]	<223>	截短的人CD19报告分子	
[1536]	<400>	66	
[1537]		atgccacctc caaggtgct gttctttctg ctgtttctga cccaatgga ggtgcggcca	60
[1538]		gaggagccac tgggtgtgaa ggtggaggag ggcgacaacg ccgtgctgca gtgtctgaag	120
[1539]		ggcacaagcg atggccctac ccagcagctg acatggtcta gagagagccc tctgaagcca	180
[1540]		ttctgaagc tgtccctggg cctgccaggc ttaggaatcc atatgaggcc cctggctatc	240
[1541]		tggctgttta tcttcaacgt gagccagcag atgggaggt tctatctgtg ccagccagga	300
[1542]		ccacctagcg agaaggcatg gcagcctgga tggaccgtga acgtggaggg cagcgagag	360
[1543]		ctgtttcgct ggaacgtgag cgacctggga ggcctgggat gtggcctgaa gaaccggagc	420
[1544]		tccgagggac cctctagccc tagcggcaag ctgatgtccc caaagctgta cgtgtgggcc	480
[1545]		aaggatagac cagagatctg ggaggagag ccaccatgcc tgccccaag ggacagcctg	540
[1546]		aatcagtccc tgtctcagga tctgaccatg gccccggct ctacactgtg gctgagctgt	600
[1547]		ggagtgccac ctgacagcgt gtccccgggc cctctgagct ggaccacgt gcacccaaag	660
[1548]		ggccccaagt ccctgtgtc tctggagctg aaggacgac gccctgccc ggacatgtgg	720
[1549]		gtcatggaga caggcctgct gctgccacgc gccacagcac aggatgccg caagtactat	780
[1550]		tgccaccggg gcaacctgac catgagctt cacctggaga tcacagccag acccgtgctg	840
[1551]		tggcactggc tgctgaggac cggaggatgg aaggtgtccg ccgtgaccct ggcatacctg	900
[1552]		atcttctgtc tgtgtccct ggtgggcatc ctgcacctg	939
[1553]	<210>	67	

[1554]	<211>	741	
[1555]	<212>	DNA	
[1556]	<213>	人工序列	
[1557]	<220>		
[1558]	<223>	ScFV 15E7	
[1559]	<400>	67	
[1560]		gatgtgctga tgaccagat tccctttagc ctgccagtga gcctgggcga ccaggcctcc	60
[1561]		atctcttgca gaagctccca gtccatcgtg cacaggtctg gcaacaccta cctggagtgg	120
[1562]		tatctgcaga agcctggcca gtcccaaaag ctgctgatct acaaggtgag caatagattc	180
[1563]		tccggagtgc cagacagggt tagcggctcc ggctctggca ccgatttcac actgaagatc	240
[1564]		tcccgctgg aggagagga tctgggcgtg tactattgct tccagggtc tcacctgcc	300
[1565]		cctacatttg gcggcgccac cacactggag atcaaggag gaggaggcag cggcggagga	360
[1566]		ggctccggcg gcggcgctc tcagggtcag ctgcagcagc ctggagcaga gctggtgcgg	420
[1567]		cccggctcta gcgtgaagct gtcttgaag gccagcggct acaccttcac agactattgg	480
[1568]		atggattggg tgaagcagag gcctggacag ggcctggagt ggatcggcac catctacca	540
[1569]		agcgactcct ctacacacta taaccaggag tttaaggca aggccaccat gacagtggac	600
[1570]		aagagctcct ctaccgccta tatgcacctg agctccctga catctgagga tagcgccgtg	660
[1571]		tactattgcg cccgcgaggg cctggccggc gtgttctact ttgattattg gggccagggc	720
[1572]		accacactga ccgtctcgag c	741
[1573]	<210>	68	
[1574]	<211>	726	
[1575]	<212>	DNA	
[1576]	<213>	人工序列	
[1577]	<220>		
[1578]	<223>	ScFV LFTT1	
[1579]	<400>	68	
[1580]		gatattcaca tgactcagag ccctagtcca ctgtccgcct cactgggggg gaaagtcacc	60
[1581]		atcacctgta aagcatctca ggacatcaac aggtacatcg cctggtatca gcacaagcca	120
[1582]		ggcaagggac ctaggtgct gatccacttc acctctacac tgcagagcgg cateccctcc	180
[1583]		cggttcagcg gctccggctc tggaagagac tacagctttt ccatctctaa tctggagcct	240
[1584]		gaggatatcg ccacctacta ttgcctgcag tatgacgac tgcggacctt tggcggcggc	300
[1585]		acaaagctgg agatcaaggg aggaggagc tccggcgag gaggctctgg cggcggcggc	360
[1586]		agccagatcc agctggtgca gagcgcccca gagctgaaga agcccggcga gacagtgaag	420
[1587]		atctcttgta aggccagcgg ctacacattc accacatatg gcatgtcctg ggtgaagcag	480
[1588]		gcacctggca agggcctgaa gtggatgggc tggatctaca cctattccgg cgtgccaaca	540
[1589]		tacgccgacg atctggaggg ccggttcgcc ttttctctgg agacaagcgc cagcaccgcc	600
[1590]		tacctgcaga tcaacaatct gaagaacgag gacaccgcca catatTTTTT cgccagggtg	660
[1591]		cgggatggct attacagata cgctatggac tattggggac aggggacctc agtgactgtc	720
[1592]		tcgagc	726
[1593]	<210>	69	
[1594]	<211>	3141	
[1595]	<212>	DNA	

[1596]	<213>	人工序列	
[1597]	<220>		
[1598]	<223>	LFTT1铰链CH2CH3 hIgG4	
[1599]	<400>	69	
[1600]	atgaaactgc ccgtgagact gctggtgctg atgttttggga ttcccgccttc ctcgagcgat	60	
[1601]	attcacatga ctcagagccc tagttcactg tccgcctcac tgggggggaa agtcaccatc	120	
[1602]	acctgtaaag catctcagga catcaacagg tacatcgctt ggtatcagca caagccaggc	180	
[1603]	aagggaacctt ggctgctgat ccacttcacc tctacactgc agagcggcat cccctcccgg	240	
[1604]	ttcagcggct ccggctcttg aagagactac agctttttcca tctctaattct ggagcctgag	300	
[1605]	gatatcgcca cctactattg cctgcagtat gacgatctgc ggacctttgg cggcggcaca	360	
[1606]	aagctggaga tcaagggagg aggaggctcc ggaggaggag gctctggcgg cggcggcagc	420	
[1607]	cagatccagc tgggtcagag cggcccagag ctgaagaagc ccggcgagac agtgaagatc	480	
[1608]	tcttgaagg ccagcggcta cacattcacc acatatggca tgtcctgggt gaagcaggca	540	
[1609]	cctggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atctacacct attccggcgt gccaacatac	600	
[1610]	gccgacgatc tggagggccg gtctgccttt tctctggaga caagcgccag caccgcctac	660	
[1611]	ctgcagatca acaatctgaa gaacgaggac accgccacat atttttgcgc cagggtgcgg	720	
[1612]	gatggctatt acagatacgc tatggactat tggggacagg ggacctcagt gactgtctcg	780	
[1613]	agcgagagca agtacggccc accctgccct ccatgtccag caccacctgt ggcaggacct	840	
[1614]	tccgtgttcc tgtttccacc caagcctaag gacacactga tgatctcccg gacccagag	900	
[1615]	gtgacatgcg tgggtggtgga cgtgtctcag gaggacccc aggtgcagtt caactggtac	960	
[1616]	gtggatggcg tggaggtgca caatgccaa accaagcccc gcgaggagca gtttcagtcc	1020	
[1617]	acctaccggg tgggtgtctgt gctgacagtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	1080	
[1618]	tataagtgca aggtgagcaa taagggcctg ccttcctcta tcgagaagac catctccaag	1140	
[1619]	gccaaaggcc agcccagaga gcctcaggtg tacacactgc ctccatctca ggaggagatg	1200	
[1620]	accaagaacc aggtgagcct gacatgtctg gtgaagggt tctatccatc cgacatcgcc	1260	
[1621]	gtggagtggg agtctaattg ccagcccag aacaattaca agaccacacc ccctgtgctg	1320	
[1622]	gactccgatg gctctttctt tctgtattct cgcctgaccg tggataagag ccggtggcag	1380	
[1623]	gagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaaatca ctacacacag	1440	
[1624]	aagtctctga gcctgtccct gggcaagttt tgggtgctgg tgggtggtggg aggctgctg	1500	
[1625]	gcctgttatt ctctgctggt gaccgtggcc ttcatcatct tttgggtgcg cagcaagcgg	1560	
[1626]	agccggtgcg tgcactccga ctacatgaac atgaccccaa gacggcccgg accaacaagg	1620	
[1627]	aagcactacc agccttatgc accaccccgc gattttgcag cataccggag caagagaggc	1680	
[1628]	aggaagaagc tgctgtatat cttcaagcag cccttcctgc ggcccgtgca gaccacacag	1740	
[1629]	gaggaggacg gctgctcctg taggttccct gaagaggagg agggaggatg cgagctgaga	1800	
[1630]	gtgaagtttt ctaggagcgc cgatgcacca gcataccagc agggacagaa tcagctgtat	1860	
[1631]	aacgagctga atctgggcag gcgcgaggag tacgacgtgc tggataagag gagaggacgg	1920	
[1632]	gaccccgaga tgggaggcaa gccaaaggcg aagaaccccc aggaggccct gtacaatgag	1980	
[1633]	ctgcagaagg acaagatggc cgaggcctat agcgagatcg gcatgaaggg agagcggaga	2040	
[1634]	aggggcaagg gacacgatgg cctgtaccag ggcctgtcca ccgccacaaa ggacacctat	2100	
[1635]	gatgccctgc acatgcaggc cctgcctcca aggggcagcg gagccacaaa cttctccctg	2160	
[1636]	ctgaagcagg ccggcgatgt ggaggagaat cctggaccaa tgccacctcc aaggctgctg	2220	
[1637]	ttctttctgc tgtttctgac cccaatggag gtgcggccag aggagccact ggtggtgaag	2280	

[1638]	gtggaggagg gcgacaacgc cgtgctgcag tgtctgaagg gcacaagcga tggccctacc	2340
[1639]	cagcagctga catggtctag agagagccct ctgaagccat tcctgaagct gtccctgggc	2400
[1640]	ctgccagget taggaatcca tatgaggccc ctggctatct ggctgtttat cttcaacgtg	2460
[1641]	agccagcaga tgggaggctt ctatctgtgc cagccaggac cacctagcga gaaggcatgg	2520
[1642]	cagcctggat ggaccgtgaa cgtggagggc agcggagagc tgtttcgtg gaacgtgagc	2580
[1643]	gacctgggag gcctgggatg tggcctgaag aaccggagct ccgagggacc ctctagccct	2640
[1644]	agcggaagc tgatgtcccc aaagctgtac gtgtgggcca aggatagacc agagatctgg	2700
[1645]	gaggagagc caccatgcct gcctccaagg gacagcctga atcagtcct gtctcaggat	2760
[1646]	ctgaccatgg cccccggctc tacactgtgg ctgagctgtg gagtgccacc tgacagcgtg	2820
[1647]	tcccggggcc ctctgagctg gacccacgtg caccctaaagg gccccaagtc cctgctgtct	2880
[1648]	ctggagctga aggacgatcg ccctgcccg gacatgtggg tcatggagac aggctgtctg	2940
[1649]	ctgccacgcg ccacagcaca ggatgccgc aagtactatt gccaccggg caacctgacc	3000
[1650]	atgagcttcc acctggagat cacagccaga cccgtgctgt ggcaactggct gctgaggacc	3060
[1651]	ggaggatgga aggtgtccgc cgtgaccctg gcataacctga ttttctgtct gtgctccctg	3120
[1652]	gtgggcatcc tgcacctgtg a	3141
[1653]	<210> 70	
[1654]	<211> 2814	
[1655]	<212> DNA	
[1656]	<213> 人工序列	
[1657]	<220>	
[1658]	<223> LFTT1 CH3 hIgG4	
[1659]	<400> 70	
[1660]	atgaaactgc ccgtgagact gctggtgctg atgttttga tccccgttc ctcgagcgat	60
[1661]	attcacatga ctcagagccc tagttcactg tccgcctcac tgggggggaa agtcaccatc	120
[1662]	acctgtaaag catctcagga catcaacagg tacatcgctt ggtatcagca caagccaggc	180
[1663]	aagggaacct ggctgctgat ccacttcacc tctacactgc agagcggcat cccctcccg	240
[1664]	ttcagcggct ccggctctgg aagagactac agcttttcca tctctaactt ggagcctgag	300
[1665]	gatatcgcca cctactattg cctgcagtat gacgatctgc ggacctttgg cggcggcaca	360
[1666]	aagctggaga tcaaggagg aggagctcc ggcgaggag gctctggcgg cggcggcagc	420
[1667]	cagatccagc tgggtcagag cggcccagag ctgaagaagc ccggcgagac agtgaagatc	480
[1668]	tcttgaagg ccagcgcta cacattcacc acatatggca tgtcctgggt gaagcaggca	540
[1669]	cctggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atctacacct attccggcgt gccaacatac	600
[1670]	gccgacgatc tggaggccg gttcgccttt tctctggaga caagcgccag caccgcctac	660
[1671]	ctgcagatca acaatctgaa gaacgaggac accgccacat atttttgcgc cagggtgcgg	720
[1672]	gatggctatt acagatacgc tatggactat tggggacagg ggacctcagt gactgtctcg	780
[1673]	agcgagagca agtacggccc accctgccct ccatgtccag gccagcccag agagcctcag	840
[1674]	gtgtacacac tgcctccatc tcaggaggag atgaccaaga accaggtag cctgacatgt	900
[1675]	ctgggtgaagg gcttctatcc atccgacatc gccgtggagt gggagtctaa tggccagccc	960
[1676]	gagaacaatt acaagaccac acccctgtg ctggactccg atggctcttt ctttctgtat	1020
[1677]	tctgcctga ccgtggataa gagccggtgg caggagggca acgtgttcag ctgctccgtg	1080
[1678]	atgcacgagg ccctgcacaa tctactacaca cagaagtctc tgagcctgtc cctgggcaag	1140
[1679]	ttttgggtgc tgggtggtgt gggaggcgtg ctggcctgtt attctctgct ggtgaccgtg	1200

[1680]	gccttcatca tcttttgggt gcgcagcaag cggagccggc tgctgcactc cgactacatg	1260
[1681]	aacatgaccc caagacggcc cggaccaaca aggaagcact accagcctta tgcaccaccc	1320
[1682]	cgcgattttg cagcataccg gagcaagaga ggcaggaaga agctgctgta tatcttcaag	1380
[1683]	cagcccttca tgcggcccggt gcagaccaca caggaggagg acggctgctc ctgtaggttc	1440
[1684]	cctgaagagg aggaggagg atgcgagctg agagtgaagt tttctaggag cgccgatgca	1500
[1685]	ccagcatacc agcagggaca gaatcagctg tataacgagc tgaatctggg caggcgcgag	1560
[1686]	gagtacgacg tgctggataa gaggagagga cgggaccccg agatgggagg caagccaagg	1620
[1687]	cgcaagaacc cccaggagg cctgtacaat gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc	1680
[1688]	tatagcgaga tcggcatgaa gggagagcgg agaaggggca agggacacga tggcctgtac	1740
[1689]	cagggcctgt ccaccgccac aaaggacacc tatgatgccc tgcacatgca ggccctgcct	1800
[1690]	ccaaggggca gcggagccac aaacttctcc ctgctgaagc aggccggcga tgtggaggag	1860
[1691]	aatcctggac caatgccacc tccaagctg ctgttcttct tgctgtttct gacccaatg	1920
[1692]	gagtgcggc cagaggagcc actggtggtg aaggtggagg agggcgacaa cgccgtgctg	1980
[1693]	cagtgtctga agggcacaag cgatggccct acccagcagc tgacatggtc tagagagagc	2040
[1694]	cctctgaagc cattcctgaa gctgtccctg ggcctgccag gcttaggaat ccatatgagg	2100
[1695]	cccttggeta tctggtgtt tatcttcaac gtgagccagc agatgggagg cttctatctg	2160
[1696]	tgccagccag gaccacctag cgagaaggca tggcagcctg gatggaccgt gaacgtggag	2220
[1697]	ggcagcggag agctgtttcg ctggaacgtg agcgacctgg gaggcctggg atgtggcctg	2280
[1698]	aagaaccgga gctccgagg accctctagc cctagcggca agctgatgtc cccaaagctg	2340
[1699]	tacgtgtggg ccaaggatag accagagatc tgggaggagg agccaccatg cctgcctcca	2400
[1700]	agggacagcc tgaatcagtc cctgtctcag gatctgacca tggcccccg ctctacactg	2460
[1701]	tggctgagct gtggagtgc acctgacagc gtgtcccggg gccctctgag ctggaccac	2520
[1702]	gtgcacccaa agggcccaa gtccctgctg tctctggagc tgaaggacga tcgccctgcc	2580
[1703]	cgggacatgt gggatcatga gacaggcctg ctgctgccac gcgccacagc acaggatgcc	2640
[1704]	ggcaagtact attgccaccg gggcaacctg accatgagct tccacctgga gatcacagcc	2700
[1705]	agaccctgtc tgtggcactg gctgctgagg accggaggat ggaaggtgtc cgccgtgacc	2760
[1706]	ctggcatacc tgattttctg tctgtgtctc ctggtgggca tctgcacct gtga	2814
[1707]	<210> 71	
[1708]	<211> 2493	
[1709]	<212> DNA	
[1710]	<213> 人工序列	
[1711]	<220>	
[1712]	<223> LFTT1 hIgG4	
[1713]	<400> 71	
[1714]	atgaaactgc ccgtgagact gctggtgctg atgttttggg ttcccgttc ctcgagcgat	60
[1715]	attcacatga ctcagagccc tagttcactg tccgcctcac tgggggggaa agtcaccatc	120
[1716]	acctgtaaag catctcagga catcaacagg tacatgcct ggtatcagca caagccaggc	180
[1717]	aagggacctg ggctgctgat ccacttcacc tctacactgc agagcggcat cccctcccgg	240
[1718]	ttcagcggct ccggctctgg aagagactac agcttttcca tctctaactt ggagcctgag	300
[1719]	gatatcgcca cctactattg cctgcagtat gacgatctgc ggacctttgg cggcggcaca	360
[1720]	aagctggaga tcaaggagg aggaggctcc ggcgaggagg gctctggcgg cggcggcagc	420
[1721]	cagatccagc tgggtgcagag cggcccagag ctgaagaagc ccggcgagac agtgaagatc	480

[1722]	tcttctaagg ccagcggcta cacattcacc acatatggca tgtcctgggt gaagcaggca	540
[1723]	cctggcaagg gcctgaagtg gatgggcttg atctacacct attccggcgt gccaacatac	600
[1724]	gccgacgac tggagggccg gtctgccttt tctctggaga caagcgccag caccgcctac	660
[1725]	ctgcagatca acaatctgaa gaacgaggac accgccacat atttttgcgc cagggtgcgg	720
[1726]	gatggctatt acagatacgc tatggactat tggggacagg ggacctcagt gactgtctcg	780
[1727]	agcgagagca agtacggccc accctgccct ccatgtccat tttgggtgct ggtggtggtg	840
[1728]	ggaggcgtgc tggcctgtta ttctctgctg gtgacctgg ctttcatcat cttttgggtg	900
[1729]	cgcagcaagc ggagccggt gctgcactcc gactacatga acatgacccc aagacggccc	960
[1730]	ggaccaacaa ggaagcacta ccagccttat gcaccacccc gcgattttgc agcataccgg	1020
[1731]	agcaagagag gcaggaagaa gctgctgtat atcttcaagc agcccttcat gcggcccgtg	1080
[1732]	cagaccacac aggaggagga cggctgctcc tgtaggttcc ctgaagagga ggaggagga	1140
[1733]	tgcgagctga gagtgaagtt ttctaggagc gccgatgcac cagcatacca gcaggacag	1200
[1734]	aatcagctgt ataacgagct gaatctgggc aggcgcgagg agtacgacgt gctggataag	1260
[1735]	aggagaggac gggaccccga gatgggaggc aagccaaggc gcaagaaccc ccaggagggc	1320
[1736]	ctgtacaatg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct atagcgagat cggcatgaag	1380
[1737]	ggagagcgga gaaggggcaa gggacacgat ggctgtacc agggcctgtc caccgccaca	1440
[1738]	aaggacacct atgatgccct gcacatgcag gccctgcctc caaggggcag cggagccaca	1500
[1739]	aacttctccc tgctgaagca ggccggcgat gtggaggaga atcctggacc aatgccacct	1560
[1740]	ccaaggctgc tgttctttct gctgtttctg accccaatgg aggtgcggcc agaggagcca	1620
[1741]	ctggtggtga aggtggagga gggcgacaac gccgtgctgc agtgtctgaa gggcacaagc	1680
[1742]	gatggcccta ccagcagct gacatggtct agagagagcc ctctgaagcc attcctgaag	1740
[1743]	ctgtccctgg gcctgccagg cttaggaatc catatgaggc ccctggctat ctggctgttt	1800
[1744]	atcttcaacg tgagccagca gatgggaggc ttctatctgt gccagccagg accacctagc	1860
[1745]	gagaaggcat ggcagcctgg atggaccgtg aacgtggagg gcagcggaga gctgtttcgc	1920
[1746]	tggaacgtga gcgacctggg aggcctggga tgtggcctga agaaccggag ctccgaggga	1980
[1747]	ccctctagcc ctagcggcaa gctgatgtcc ccaaagctgt acgtgtgggc caaggataga	2040
[1748]	ccagagatct gggagggaga gccaccatgc ctgcctcaa gggacagcct gaatcagtcc	2100
[1749]	ctgtctcagg atctgacct ggccccggc tctacactgt ggctgagctg tggagtgcc	2160
[1750]	cctgacagcg tgtcccgagg ccctctgagc tggaccacg tgcacccaaa gggccccaag	2220
[1751]	tccctgctgt ctctggagct gaaggacgat cgccctgccc gggacatgtg ggtcatggag	2280
[1752]	acaggcctgc tgctgccag cgccacagca caggatgccg gcaagtacta ttgccaccgg	2340
[1753]	ggcaacctga ccatgagctt ccacctggag atcacagcca gacctgtgt gtggcactgg	2400
[1754]	ctgtgagga ccggaggatg gaaggtgtcc gccgtgaccc tggcatacct gatcttctgt	2460
[1755]	ctgtgctccc tgggtgggcat cctgcacctg tga	2493
[1756]	<210>	72
[1757]	<211>	3156
[1758]	<212>	DNA
[1759]	<213>	人工序列
[1760]	<220>	
[1761]	<223>	15E7 CH2CH3 hIgG4
[1762]	<400>	72
[1763]	atgaaactgc ccgtgagact gctggtgctg atgttttggga ttcccgttc ctgagcgat	60

[1764]	gtgctgatga cccagattcc ctttagcctg ccagttagcc tgggcgacca ggcctccatc	120
[1765]	tcttgcagaa gctcccagtc catcgtgcac aggtctggca acacctacct ggagtggat	180
[1766]	ctgcagaagc ctggccagtc cccaaagctg ctgactaca aggtgagcaa tagattctcc	240
[1767]	ggagtgccag acaggtttag cggctccggc tctggcaccg atttcacact gaagatctcc	300
[1768]	cgcgtggagg cagaggatct gggcgtgtac tattgcttcc agggctctca cctgccccct	360
[1769]	acatttgccg gcggcaccac actggagatc aaggaggag gaggcagcgg cggaggaggc	420
[1770]	tccggcggcg gcggctctca ggtgcagctg cagcagcctg gagcagagct ggtgcggccc	480
[1771]	ggctctagcg tgaagctgtc ttgtaaggcc agcggctaca ctttcacaga ctattggatg	540
[1772]	gattgggtga agcagaggcc tggacaggcg ctggagtgga tcggcaccat ctaccaagc	600
[1773]	gactcctcta cacactataa ccaggagttt aagggaagg ccacctgac agtggacaag	660
[1774]	agctcctcta ccgctatat gcacctgagc tccctgacat ctgaggatag cgccgtgtac	720
[1775]	tattgcgcc gcgaggcct ggccggcgtg ttctactttg attattggg ccagggcacc	780
[1776]	acactgaccg tctcgagcga gagcaagtac ggcccaccct gccctccatg tccagcacca	840
[1777]	cctgtggcag gacctccgt gttcctgttt ccaccaagc ctaaggacac actgatgatc	900
[1778]	tcccgacccc cagaggtagc atgcgtggtg gtggacgtgt ctcaggagga cccgaggtg	960
[1779]	cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcacaatg ccaagaccaa gcccgcgag	1020
[1780]	gagcagtttc agtccaccta ccgggtggtg tctgtgtga cagtgtgca ccaggactgg	1080
[1781]	ctgaacggca aggagtataa gtgcaaggcg agcaataagg gcctgccttc ctctatcgag	1140
[1782]	aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc agagagcctc aggtgtacac actgcctcca	1200
[1783]	tctcaggagg agatgaccaa gaaccagtg agcctgacat gtctggtgaa gggcttctat	1260
[1784]	ccatccgaca tcgccgtgga gtgggagtct aatggccagc ccgagaacaa ttacaagacc	1320
[1785]	acaccccctg tgctggactc cgatggctct ttctttctgt attctcgcct gaccgtggat	1380
[1786]	aagagccggt ggcaggaggg caacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac	1440
[1787]	aatcactaca cacagaagtc tctgagcctg tccctgggca agttttgggt gctggtggtg	1500
[1788]	gtgggaggcg tgctggcctg ttattctctg ctggtgaccg tggccttcat catcttttgg	1560
[1789]	gtgcgcagca agcggagccg gctgctgcac tccgactaca tgaacatgac cccaagacgg	1620
[1790]	cccgaccaa caaggaagca ctaccagcct tatgcaccac cccgcgattt tgcagcatac	1680
[1791]	cggagcaaga gaggcaggaa gaagctgctg tatatcttca agcagccctt catgcggccc	1740
[1792]	gtgcagacca cacaggagga ggacggctgc tctgttaggt tccctgaaga ggaggaggga	1800
[1793]	ggatgcgagc tgagagtga gttttctagg agcggcgatg caccagcata ccagcaggga	1860
[1794]	cagaatcagc tgtataacga gctgaatctg ggcaggcgcg aggagtacga cgtgctggat	1920
[1795]	aagaggagag gacgggaccc cgagatggga ggcaagccaa ggcgcaagaa ccccaggag	1980
[1796]	ggcctgtaca atgagctgca gaaggacaag atggccgagg cctatagcga gatcggcctg	2040
[1797]	aaggagagc ggagaagggg caagggacac gatggcctgt accaggcct gtccaccgcc	2100
[1798]	acaaaggaca cctatgatgc cctgcacatg caggccctgc ctccaaggg cagcggagcc	2160
[1799]	acaaacttct ccctgtgaa gcaggccggc gatgtggagg agaatcctgg accaatgcca	2220
[1800]	cctccaagcg tgctgttctt tctgctgttt ctgaccccaa tggaggtgcg gccagaggag	2280
[1801]	ccactggtgg tgaagtgga ggaggcgac aacgccgtgc tgcagtgtct gaagggcaca	2340
[1802]	agcgatggcc ctaccagca gctgacatgg tctagagaga gccctctgaa gccattcctg	2400
[1803]	aagctgtccc tgggcctgcc aggcttagga atccatatga ggcccctggc tatctggctg	2460
[1804]	tttatcttca acgtgagcca gcagatggga ggcttctatc tgtgccagcc aggaccacct	2520
[1805]	agcgagaagg catggcagcc tggatggacc gtgaacgtgg agggcagcgg agagctgttt	2580

[1806]	cgctggaacg tgagcgacct gggaggcctg ggatgtggcc tgaagaaccg gagctccgag	2640
[1807]	ggaccctcta gccctagcgg caagctgatg tccccaaagc tgtacgtgtg ggccaaggat	2700
[1808]	agaccagaga tctgggaggg agagccacca tgccctgcctc caaggacag cctgaatcag	2760
[1809]	tccctgtctc aggatctgac catggccccc ggctctacac tgtggctgag ctgtggagt	2820
[1810]	ccacctgaca gcgtgtcccg gggccctctg agctggaccc acgtgcaccc aaagggtccc	2880
[1811]	aagtccctgc tgtctctgga gctgaaggac gatcgccctg cccgggacat gtgggtcatg	2940
[1812]	gagacaggcc tgctgtgcc acgcgccaca gcacaggatg cggcaagta ctattgccac	3000
[1813]	cggggaacc tgaccatgag cttccacctg gagatcacag ccagaccgt gctgtggcac	3060
[1814]	tggctgctga ggaccggagg atggaagggtg tccgccgtga ccctggcata cctgattttc	3120
[1815]	tgtctgtgct ccctggtggg catcctgcac ctgtga	3156
[1816]	<210>	73
[1817]	<211>	2829
[1818]	<212>	DNA
[1819]	<213>	人工序列
[1820]	<220>	
[1821]	<223>	15E7 CH3 hIgG4
[1822]	<400>	73
[1823]	atgaaactgc ccgtgagact gctggtgctg atgttttga ttcccgttc ctcgagcgat	60
[1824]	gtgctgatga cccagattcc ctttagcctg ccagttagcc tgggcgacca ggcctccatc	120
[1825]	tcttgacaga gctcccagtc catcgtgcac aggtctggca acacctacct ggagtggat	180
[1826]	ctgcagaagc ctggccagtc cccaaagctg ctgatctaca aggtgagcaa tagattctcc	240
[1827]	ggagtgccag acaggtttag cggctccggc tctggcaccg atttcacact gaagatctcc	300
[1828]	cgcgtggagg cagaggatct gggcgtgtac tattgcttcc agggctctca cctgccccct	360
[1829]	acatttgcg gcggcaccac actggagatc aaggaggag gaggcagcgg cggaggaggc	420
[1830]	tccggcggcg gcggctctca ggtgcagctg cagcagcctg gagcagagct ggtgcggccc	480
[1831]	ggctctagcg tgaagctgtc ttgtaaggcc agcggctaca ctttcacaga ctattggatg	540
[1832]	gattgggtga agcagaggcc tggacagggc ctggagtga tcggcaccat ctaccaagc	600
[1833]	gactcctcta cacactataa ccaggagttt aagggaagg ccacctgac agtggacaag	660
[1834]	agctcctcta ccgctatat gcacctgagc tcctgacat ctgaggatag cgcctgtac	720
[1835]	tattgcgcc gcgaggcct ggccggcgtg ttctactttg attattggg ccagggcacc	780
[1836]	acactgaccg tctcgagcga gagcaagtac ggcccaccct gccctccatg tccaggccag	840
[1837]	cccagagagc ctcagggtga cacactgcct ccatctcagg aggagatgac caagaaccag	900
[1838]	gtgagcctga catgtctggt gaagggttc tatccatccg acatcgccgt ggagtgggag	960
[1839]	tctaattggc agcccagaa caattacaag accacacccc ctgtgctgga ctccgatggc	1020
[1840]	tctttctttc tgtattctcg cctgaccgtg gataagagcc ggtggcagga gggcaacgtg	1080
[1841]	ttcagctgct ccgtgatgca cgaggccctg cacaatcact acacacagaa gtctctgagc	1140
[1842]	ctgtccctgg gcaagttttg ggtgctggtg gtgggtgggag gcgtgctggc ctgtttattc	1200
[1843]	ctgtggtga ccgtggcctt catcatcttt tgggtgcga gcaagcggag ccggtgctg	1260
[1844]	cactccgact acatgaacat gaccccaaga cggcccgac caacaaggaa gcaactaccag	1320
[1845]	ccttatgcac caccgccga ttttgacga taccggagca agagaggcag gaagaagctg	1380
[1846]	ctgtatatct tcaagcagcc cttcatgcgg cccgtgcaga ccacacagga ggaggacggc	1440
[1847]	tgctcctgta ggttcctga agaggaggag ggaggatgcg agctgagagt gaagttttct	1500

[1848]	aggagcgccg atgcaccagc ataccagcag ggacagaatc agctgtataa cgagctgaat	1560
[1849]	ctgggcaggc gcgaggagta cgacgtgctg gataagagga gaggacggga ccccgagatg	1620
[1850]	ggaggaagc caaggcgaa gaacccccag gagggcctgt acaatgagct gcagaaggac	1680
[1851]	aagatggccg aggcctatag cgagatcggc atgaaggag agcggagaag gggcaaggga	1740
[1852]	cacgatggcc tgtaccaggc cctgtccacc gccacaaagg acacctatga tgccctgcac	1800
[1853]	atgcaggccc tgcctccaag gggcagcgga gccacaaact tctccctgct gaagcaggcc	1860
[1854]	ggcgatgtgg aggagaatcc tggaccaatg ccacctcaa ggctgctgtt ctttctgctg	1920
[1855]	tttctgacct caatggaggt gcggccagag gagccactgg tggatgaaggt ggaggagggc	1980
[1856]	gacaacgccg tgctgcagtg tctgaagggc acaagcgatg gccctacca gcagctgaca	2040
[1857]	tggcttagag agagccctct gaagccattc ctgaagctgt ccctgggcct gccaggctta	2100
[1858]	ggaatccata tgaggccctt ggctatcttg ctgtttatct tcaacgtgag ccagcagatg	2160
[1859]	ggagcttct atctgtgcca gccaggacca cctagcgaga aggcattgga gcctggatgg	2220
[1860]	accgtgaacg tggaggcgag cggagagctg ttctgctgga acgtgagcga cctgggaggc	2280
[1861]	ctgggatgtg gcctgaagaa ccggagctcc gagggaccct ctagccctag cggcaagctg	2340
[1862]	atgtcccaa agctgtacgt gtgggccaag gatagaccag agatctggga gggagagcca	2400
[1863]	ccatgcctgc ctccaaggga cagcctgaat cagtcctgt ctcaggatct gaccatggcc	2460
[1864]	cccggctcta cactgtggct gagctgtgga gtgccacctg acagcgtgtc ccggggccct	2520
[1865]	ctgagctgga cccacgtgca cccaaagggc cccaagtccc tgctgtctct ggagctgaag	2580
[1866]	gacgatcgcc ctgcccggga catgtgggtc atggagacag gcctgctgct gccacgcgcc	2640
[1867]	acagcacagg atgccggcaa gtactattgc caccggggca acctgacct gagcttccac	2700
[1868]	ctggagatca cagccagacc cgtgctgtgg cactggctgc tgaggaccg aggatggaag	2760
[1869]	gtgtccgccg tgaccctggc atacctgatt ttctgtctgt gctccctggt gggcaccctg	2820
[1870]	cacctgtga	2829
[1871]	<210> 74	
[1872]	<211> 2508	
[1873]	<212> DNA	
[1874]	<213> 人工序列	
[1875]	<220>	
[1876]	<223> 15E7 hIgG4	
[1877]	<400> 74	
[1878]	atgaaactgc ccgtgagact gctggtgctg atgttttga ttcccgttc ctcgagcgat	60
[1879]	gtgctgatga cccagattcc ctttagcctg ccagttagcc tgggcgacca ggcctccatc	120
[1880]	tcttgagaa gctcccagtc catcgtgcac aggtctggca acacctacct ggagtggat	180
[1881]	ctgcagaagc ctggccagtc cccaaagctg ctgatctaca aggtgagcaa tagattctcc	240
[1882]	ggagtgccag acaggtttag cggtccggc tctggcaccg atttcacact gaagatctcc	300
[1883]	cgctggagg cagaggatct gggcgtgtac tattgcttcc agggctctca cctgccccct	360
[1884]	acatttgccg gcggcaccac actggagatc aaggaggag gaggcagcgg cggaggaggc	420
[1885]	tccggcgccg gcggctctca ggtgcagctg cagcagcctg gagcagagct ggtgcggccc	480
[1886]	ggctctagcg tgaagctgtc ttgtaaggcc agcggctaca ctttcacaga ctattggatg	540
[1887]	gattgggtga agcagaggcc tggacaggcc ctggagtga tcggcaccat ctaccaagc	600
[1888]	gactcctcta cacactataa ccaggagttt aagggaagg ccacctgac agtggacaag	660
[1889]	agctcctcta ccgcctatat gcacctgagc tcctgacat ctgaggatag cgccgtgtac	720

[1890]	tattgcgccc gcgagggcct ggccggcgtg ttctactttg attattgggg ccagggcacc	780
[1891]	acactgaccg tctcgagcga gagcaagtac ggcccaccct gccctccatg tccatttttg	840
[1892]	gtgctggtgg tggtagggagg cgtgctggcc tgttattctc tgctggtgac cgtggccttc	900
[1893]	atcatctttt gggtagcag caagcggagc cggctgctgc actccgacta catgaacatg	960
[1894]	accccaagac ggcccgacc aacaaggaag cactaccagc cttatgcacc acccccgcat	1020
[1895]	tttgcagcat accggagcaa gagaggcagg aagaagctgc tgtatatctt caagcagccc	1080
[1896]	ttcatgcggc ccgtgcagac cacacaggag gaggacggct gctcctgtag gttccctgaa	1140
[1897]	gaggaggagg gaggatgcga gctgagagtg aagttttcta ggagcgccga tgcaccagca	1200
[1898]	taccagcagg gacagaatca gctgtataac gagctgaatc tgggcaggcg cgaggagtac	1260
[1899]	gacgtgctgg ataaggagg aggacgggac cccgagatgg gaggcaagcc aaggcgcaag	1320
[1900]	aacccccagg agggcctgta caatgagctg cagaaggaca agatggccga ggcctatagc	1380
[1901]	gagatcgcca tgaagggaga gcggagaagg ggcaaggac acgatggcct gtaccagggc	1440
[1902]	ctgtccaccg ccacaaagga cacctatgat gccctgcaca tgcaggccct gcctccaagg	1500
[1903]	ggcagcggag ccacaaactt ctccctgctg aagcaggccg gcgatgtgga ggagaatcct	1560
[1904]	ggaccaatgc cacctccaag gctgctgttc tttctgctgt ttctgacccc aatggaggtg	1620
[1905]	cggccagagg agccactggt ggtgaagggt gaggaggcg acaacgccgt gctgcagtgt	1680
[1906]	ctgaagggca caagcgatgg ccctaccag cagctgacat ggtctagaga gagccctctg	1740
[1907]	aagccattcc tgaagctgtc cctgggctg ccaggcttag gaatccatat gaggccctg	1800
[1908]	gctatctggc tgtttatctt caacgtgagc cagcagatgg gaggcttcta tctgtgccag	1860
[1909]	ccaggaccac ctagcgagaa ggcatggcag cctggatgga ccgtgaacgt ggagggcagc	1920
[1910]	ggagagctgt ttcgctggaa cgtgagcgac ctgggaggcc tgggatgtgg cctgaagaac	1980
[1911]	cggagctccg agggaccctc tagccctagc ggcaagctga tgtcccaaaa gctgtacgtg	2040
[1912]	tgggccaagg atagaccaga gatctgggag ggagagccac catgcctgcc tccaagggac	2100
[1913]	agcctgaatc agtccctgtc tcaggatctg accatggccc ccggctctac actgtggctg	2160
[1914]	agctgtggag tgccacctga cagcgtgtcc cggggccctc tgagctggac ccacgtgcac	2220
[1915]	ccaaagggcc ccaagtcct gctgtctctg gagctgaagg acgatcgcgc tgcccgggac	2280
[1916]	atgtgggtca tggagacagg cctgctgctg ccacgcgcca cagcacagga tgccggcaag	2340
[1917]	tactattgcc accgggcaa cctgaccatg agcttccacc tggagatcac agccagacct	2400
[1918]	gtgctgtggc actggtgct gaggaccgga ggatggaagg tgtccgccgt gaccctggca	2460
[1919]	tacctgattt tctgtctgtg ctccctgggt ggcatcctgc acctgtga	2508
[1920]	<210>	75
[1921]	<211>	21
[1922]	<212>	PRT
[1923]	<213>	人工序列
[1924]	<220>	
[1925]	<223>	鼠Ig?
[1926]	<400>	75
[1927]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
[1928]	1 5 10 15	
[1929]	Gly Ser Thr Gly Asp	
[1930]	20	
[1931]	<210>	76

[1932]	<211>	20	
[1933]	<212>	PRT	
[1934]	<213>	人工序列	
[1935]	<220>		
[1936]	<223>	人IL2信号肽	
[1937]	<400>	76	
[1938]	Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu		
[1939]	1	5	10 15
[1940]	Val Thr Asn Ser		
[1941]		20	
[1942]	<210>	77	
[1943]	<211>	19	
[1944]	<212>	PRT	
[1945]	<213>	人工序列	
[1946]	<220>		
[1947]	<223>	人IgG2	
[1948]	<400>	77	
[1949]	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
[1950]	1	5	10 15
[1951]	Val His Ser		
[1952]	<210>	78	
[1953]	<211>	17	
[1954]	<212>	PRT	
[1955]	<213>	人工序列	
[1956]	<220>		
[1957]	<223>	Gaussia luc	
[1958]	<400>	78	
[1959]	Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu		
[1960]	1	5	10 15
[1961]	Ala		
[1962]	<210>	79	
[1963]	<211>	24	
[1964]	<212>	DNA	
[1965]	<213>	人工	
[1966]	<220>		
[1967]	<223>	FlagTag	
[1968]	<400>	79	
[1969]	gactacaaag acgacgatga caag		24
[1970]	<210>	80	
[1971]	<211>	132	
[1972]	<212>	DNA	
[1973]	<213>	人工	

[1974]	<220>	
[1975]	<223>	CD28跨膜结构域
[1976]	<400>	80
[1977]	ttctgggtgc gttctaagcg gagccgcctt ctccactctg actacatgaa catgacacca	60
[1978]	cgtagaccgg gccctacacg gaaacactac cagccatatg caccaccccg ggactttgcc	120
[1979]	gcttaccgta gc	132
[1980]	<210>	81
[1981]	<211>	126
[1982]	<212>	DNA
[1983]	<213>	人工
[1984]	<220>	
[1985]	<223>	41BB结构域
[1986]	<400>	81
[1987]	aagcggggtc gaaagaagct gttgtacatc tttaaacagc ctttcatgcg ccccggtgcag	60
[1988]	acaactcaag aggaggatgg gtgttcatgt cgctttccag aggaggagga aggaggttgc	120
[1989]	gagctg	126
[1990]	<210>	82
[1991]	<211>	339
[1992]	<212>	DNA
[1993]	<213>	人工
[1994]	<220>	
[1995]	<223>	CD3z 胞内结构域
[1996]	<400>	82
[1997]	cgcgtagaagt tcaagtagaag tgccgatgcc ccggcatacc aacaaggcca gaatcagctg	60
[1998]	tacaacgagc tgaatctcgg caggcgggaa gaatacgacg tcctggataa gaggcgaggg	120
[1999]	agggaccagc agatgggcgg caaaccacagc aggaggaaga atccgcagga gggctctttat	180
[2000]	aatgaactgc agaaggataa gatggcggaa gcctattccg aaattgggat gaaaggggag	240
[2001]	agaaggagag gaaaaggcca tgatgggctg tatcagggct tgagtacagc aaccaaagac	300
[2002]	acttacgatg cactgcacat gcaggtcttg ccaccacgg	339
[2003]	<210>	83
[2004]	<211>	568
[2005]	<212>	PRT
[2006]	<213>	人工
[2007]	<220>	
[2008]	<223>	CD8a铰链
[2009]	<400>	83
[2010]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
[2011]	1 5 10 15	
[2012]	His Ala Ala Asp Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Phe Ser Leu Pro	
[2013]	20 25 30	
[2014]	Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
[2015]	35 40 45	

[2016]	Ile Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys
[2017]	50 55 60
[2018]	Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
[2019]	65 70 75 80
[2020]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[2021]	85 90 95
[2022]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
[2023]	100 105 110
[2024]	Cys Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr
[2025]	115 120 125
[2026]	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[2027]	130 135 140
[2028]	Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
[2029]	145 150 155 160
[2030]	Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[2031]	165 170 175
[2032]	Thr Asp Tyr Trp Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
[2033]	180 185 190
[2034]	Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr His Tyr Asn
[2035]	195 200 205
[2036]	Gln Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
[2037]	210 215 220
[2038]	Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[2039]	225 230 235 240
[2040]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr
[2041]	245 250 255
[2042]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser
[2043]	260 265 270
[2044]	Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro
[2045]	275 280 285
[2046]	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
[2047]	290 295 300
[2048]	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
[2049]	305 310 315 320
[2050]	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val
[2051]	325 330 335
[2052]	Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
[2053]	340 345 350
[2054]	Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly
[2055]	355 360 365
[2056]	His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
[2057]	370 375 380

[2058]	Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg	
[2059]	385	390 395 400
[2060]	Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe	
[2061]	405	410 415
[2062]	Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg	
[2063]	420	425 430
[2064]	Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser	
[2065]	435	440 445
[2066]	Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr	
[2067]	450	455 460
[2068]	Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys	
[2069]	465	470 475 480
[2070]	Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys	
[2071]	485	490 495
[2072]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala	
[2073]	500	505 510
[2074]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys	
[2075]	515	520 525
[2076]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr	
[2077]	530	535 540
[2078]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Gly Gly Ser	
[2079]	545	550 555 560
[2080]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys	
[2081]	565	
[2082]	<210>	84
[2083]	<211>	1707
[2084]	<212>	DNA
[2085]	<213>	人工
[2086]	<220>	
[2087]	<223>	CD8a铰链
[2088]	<400>	84
[2089]	atggctctcc ccgtgaccgc actgcttctg cctctggcgt tattgctaca cgccgccgac	60
[2090]	gatgtcctga tgacacaaat cccatttagc ctgcctgtat ccctgggtga tcaggccagc	120
[2091]	attagctgtc gtcctccca gtccatcgtt caccggtctg gcaacacgta tctggaatgg	180
[2092]	tacctccaga aaccggcca atcccctaag ctccttattt acaaagttag caatcgcttt	240
[2093]	tctggagtgc ctgatagatt ctgaggaagt gggttcaggaa ctgacttcac ccttaagatt	300
[2094]	agccgggttg aggccgagga tcttggtgtg tactactgct ttcaaggag tcaccttct	360
[2095]	cccacatttg gcggcgccac aactctggag atcaaagtg gtggaggag cgggtggaggt	420
[2096]	ggaagtggcg gtggcgctc acaggtgcag ttgcagcaac ccggggccga actggtcaga	480
[2097]	ccgggctcct ctgtgaagct gtcattgcaag gctagtggct ataccttcac cgactattgg	540
[2098]	atggattggg taaagcagcg gccaggacaa ggactggaat ggattgggac catttacctc	600
[2099]	agcgacagtt ctacgcacta caatcaggag ttcaaaggca aggctacaat gacagtggac	660

[2100]	aagtccagtt ctacagccta catgcacctt tctagcctca catcagagga ttccgcagtg	720
[2101]	tactattgtg caggtgaagg cctggctgga gtgttttact tcgactactg gggacagggg	780
[2102]	accaccttga cggttagctc cgccctgtcc aacagcatta tgtacttctc acatttcggt	840
[2103]	cctgtgtttc tgcccgcaaa acctactaca acccctgccc ctcgaccacc aactccagct	900
[2104]	cccactatag cctctcagcc cctgtctctc agaccagagg cctgtaggcc tgctgcggga	960
[2105]	ggagccgtgc atacccgcgg gttggacttc gcctgcgatt tctgggtgct ggtttagta	1020
[2106]	ggcggagtct tggcctgtta ttactgttg gttacagtgg cttttatcat attctgggtc	1080
[2107]	cgctccaaga gaagccgggg cgggcatagc gactacatga acatgactcc ccgacgcca	1140
[2108]	ggccccacca gaaagcacta tcagccatac gctccaccta gggattttgc ggcatatcgg	1200
[2109]	agcaaactg gcaggaagaa gctcctgtat atcttcaaac agcccttcat gcggcccgtc	1260
[2110]	cagactacgc aggaagagga cggttgcagc tgcagatttc cggaagagga ggaaggtggg	1320
[2111]	tgtgaactcc gggtaagtt tagccggagt gcagatgctc cagcgtacca acagggccag	1380
[2112]	aatcagctct ataacgaact gaatctggga aggagggagg aatatgatgt cctggataag	1440
[2113]	cgacgcgggc gcgatccga gatgggcggg aaacccaaa gacgtaagaa tccgcaggag	1500
[2114]	gggttgtaaca acgaactgca aaaggacaaa atggctgagg cctattccga gatcggaatg	1560
[2115]	aaaggggaaa ggaggagagg caaggggcat gacggcctgt atcagggggt gtctactgca	1620
[2116]	accaaagaca cctacgacgc actgcacatg caggcacttc cgccacgagg cggagggagc	1680
[2117]	gactacaaag acgacgatga caagtga	1707
[2118]	<210>	85
[2119]	<211>	533
[2120]	<212>	PRT
[2121]	<213>	人工
[2122]	<220>	
[2123]	<223>	CD28铰链结构域
[2124]	<400>	85
[2125]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
[2126]	1 5 10 15	
[2127]	His Ala Ala Asp Ile His Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
[2128]	20 25 30	
[2129]	Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile	
[2130]	35 40 45	
[2131]	Asn Arg Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg	
[2132]	50 55 60	
[2133]	Leu Leu Ile His Phe Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg	
[2134]	65 70 75 80	
[2135]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn	
[2136]	85 90 95	
[2137]	Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp	
[2138]	100 105 110	
[2139]	Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly	
[2140]	115 120 125	
[2141]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu	

[2142]	130	135	140
[2143]	Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile		
[2144]	145	150	155
[2145]	Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp		
[2146]		165	170
[2147]	Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Tyr		
[2148]		180	185
[2149]	Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Leu Glu Gly Arg Phe		
[2150]		195	200
[2151]	Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn		
[2152]		210	215
[2153]	Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Arg		
[2154]	225	230	235
[2155]	Asp Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser		
[2156]		245	250
[2157]	Val Thr Val Ser Ser Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr		
[2158]		260	265
[2159]	Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys		
[2160]		275	280
[2161]	His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp		
[2162]		290	295
[2163]	Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val		
[2164]	305	310	315
[2165]	Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu		
[2166]		325	330
[2167]	Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr		
[2168]		340	345
[2169]	Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr		
[2170]		355	360
[2171]	Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro		
[2172]		370	375
[2173]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys		
[2174]	385	390	395
[2175]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe		
[2176]		405	410
[2177]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
[2178]		420	425
[2179]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
[2180]		435	440
[2181]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg		
[2182]		450	455
[2183]	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		

[2184]	465	470	475	480
[2185]	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly			
[2186]		485	490	495
[2187]	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp			
[2188]		500	505	510
[2189]	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Asp Tyr Lys			
[2190]		515	520	525
[2191]	Asp Asp Asp Asp Lys			
[2192]	530			
[2193]	<210> 86			
[2194]	<211> 1602			
[2195]	<212> DNA			
[2196]	<213> 人工			
[2197]	<220>			
[2198]	<223> CD28铰链结构域			
[2199]	<400> 86			
[2200]	atggctctcc ctgtaaccgc actccttctg ccattggctc tcctgcttca tgccgccgat	60		
[2201]	atccatatga cccagagtcc aagctctctg agcgctagcc tgggcggcaa agtgaccata	120		
[2202]	acatgcaagg ctagccagga cattaaccgg tacatagcct ggtaccagca taagcccgga	180		
[2203]	aaagcccca gactgtgat ccacttcacc tccacactgc agtccgggat tccctcacga	240		
[2204]	ttctccgat caggttcagg tcgagactac tccttttagca tttccaacct cgaacctgag	300		
[2205]	gacatcgcca catactactg tctgcagtat gacgacctc gcacttttgg cgggtggaact	360		
[2206]	aaactggaga tcaaggcgagg aggtgggtcc ggaggcggcg ggtctggagg tggcgggagt	420		
[2207]	cagattcagc ttgtacaatc tgggcctgag ctgaagaaac ccggagaaac cgtcaagatc	480		
[2208]	agctgcaaag caagtgggta tactttcacg acgtatggca tgtcttgggt caagcaagct	540		
[2209]	cctgggaaag ggctgaaatg gatgggctgg atttacacct attctggagt tcctacatat	600		
[2210]	gccgacgatc tggaaggcg ctttgccttc agcctggaga ctagcgctc aaccgcttat	660		
[2211]	ttgcagatca acaacctcaa gaacgaagat acggcgacct atttctgtgc cagagttcgg	720		
[2212]	gatggtact atagatacgc catggattat tggggccaag gtacatccgt gaccgtttca	780		
[2213]	agctgcaaga tcgaagtgat gtaccctcct ccctatctcg acaatgagaa atccaatgga	840		
[2214]	accattatac acgtcaaggg gaagcacctg tgtcccagcc ctctgtttcc gggaccctct	900		
[2215]	aaaccatttt ggggtgtggt ggtggttagga ggagttctcg cgtgctatag cctgttggtg	960		
[2216]	actgtcgcat tcatcatctt ctgggtgcgt tctaagcgga gccgccttct ccactctgac	1020		
[2217]	tacatgaaca tgacaccacg tagaccgggc cctacacgga aacactacca gccatatgca	1080		
[2218]	ccaccccgga actttgccgc ttaccgtagc aagcggggtc gaaagaagct gttgtacatc	1140		
[2219]	tttaaacagc ctttcatgcg ccccgctcag acaactcaag aggaggatgg gtgttcatgt	1200		
[2220]	cgctttccag aggaggagga aggaggttgc gagctgcgcg tgaagttcag tagaagtgcc	1260		
[2221]	gatgccccgg cataccaaca aggccagaat cagctgtaca acgagctgaa tctcggcagg	1320		
[2222]	cgggaagaat acgacgtcct ggataagagg cgaggaggag acccagagat gggcggcaaa	1380		
[2223]	ccccagagga ggaagaatcc gcaggagggt ctttataatg aactgcagaa ggataagatg	1440		
[2224]	gcgggaagcct attccgaaat tgggatgaaa ggggagagaa ggagaggaaa aggccatgat	1500		
[2225]	gggctgtatc agggcttgag tacagcaacc aaagacactt acgatgcact gcacatgcag	1560		

[2226] gctttgccac ccagggatta caaggatgac gacgacaaat ga

1602

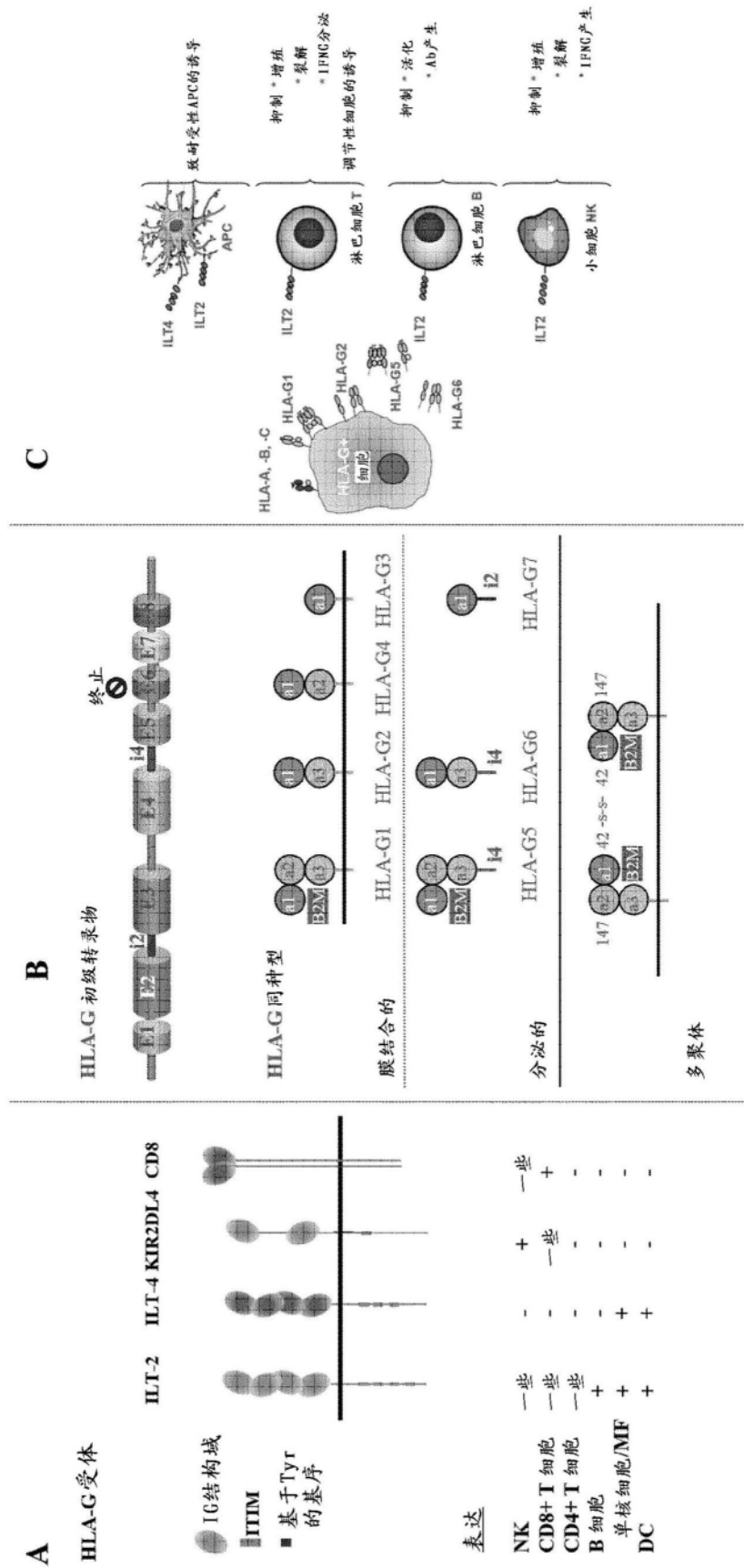


图1

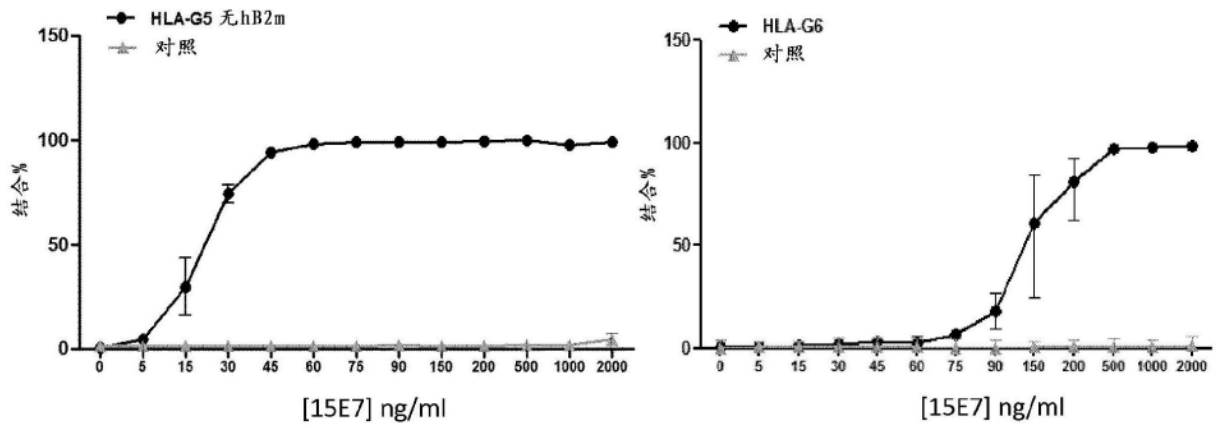
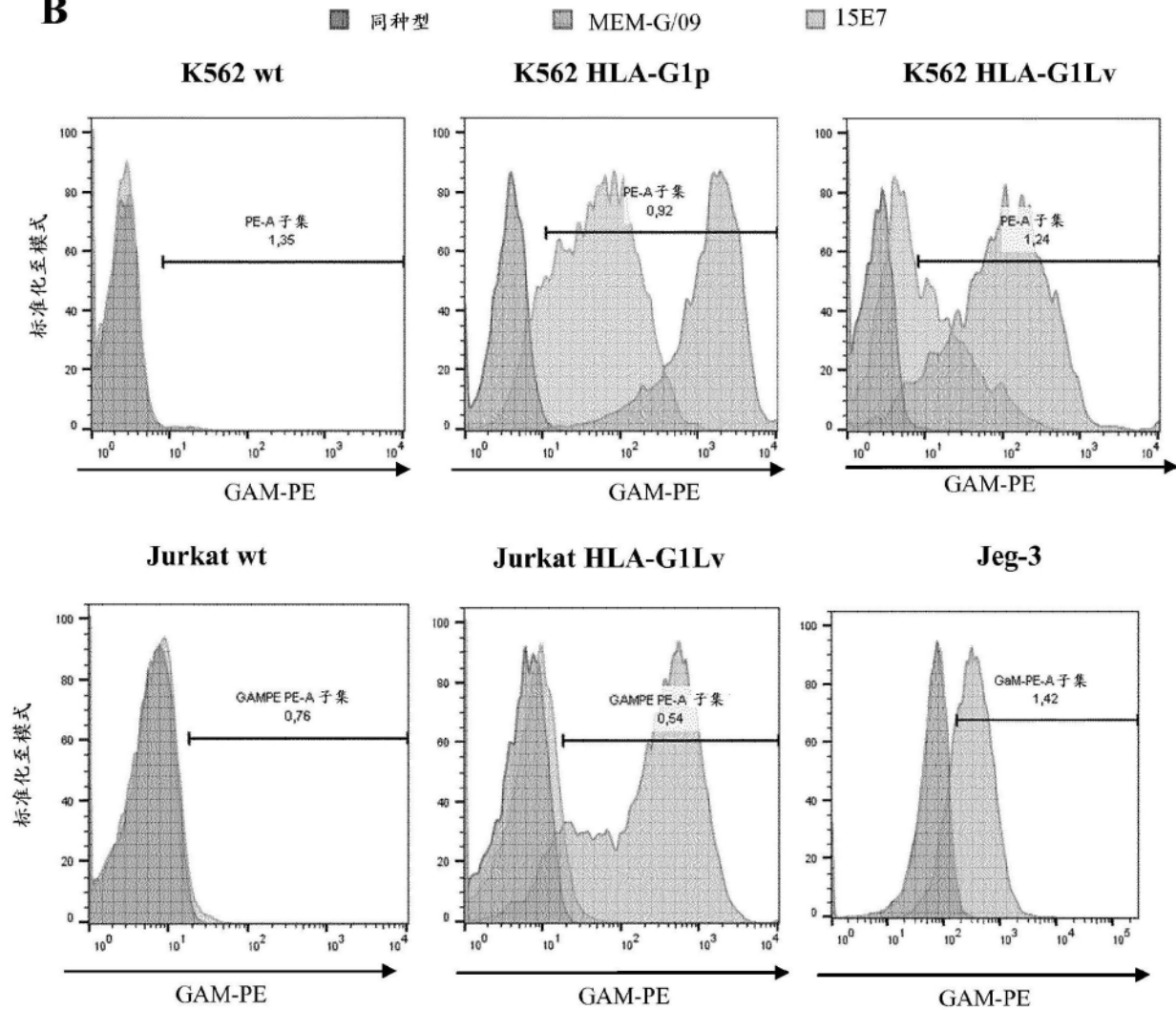
A**B**

图2

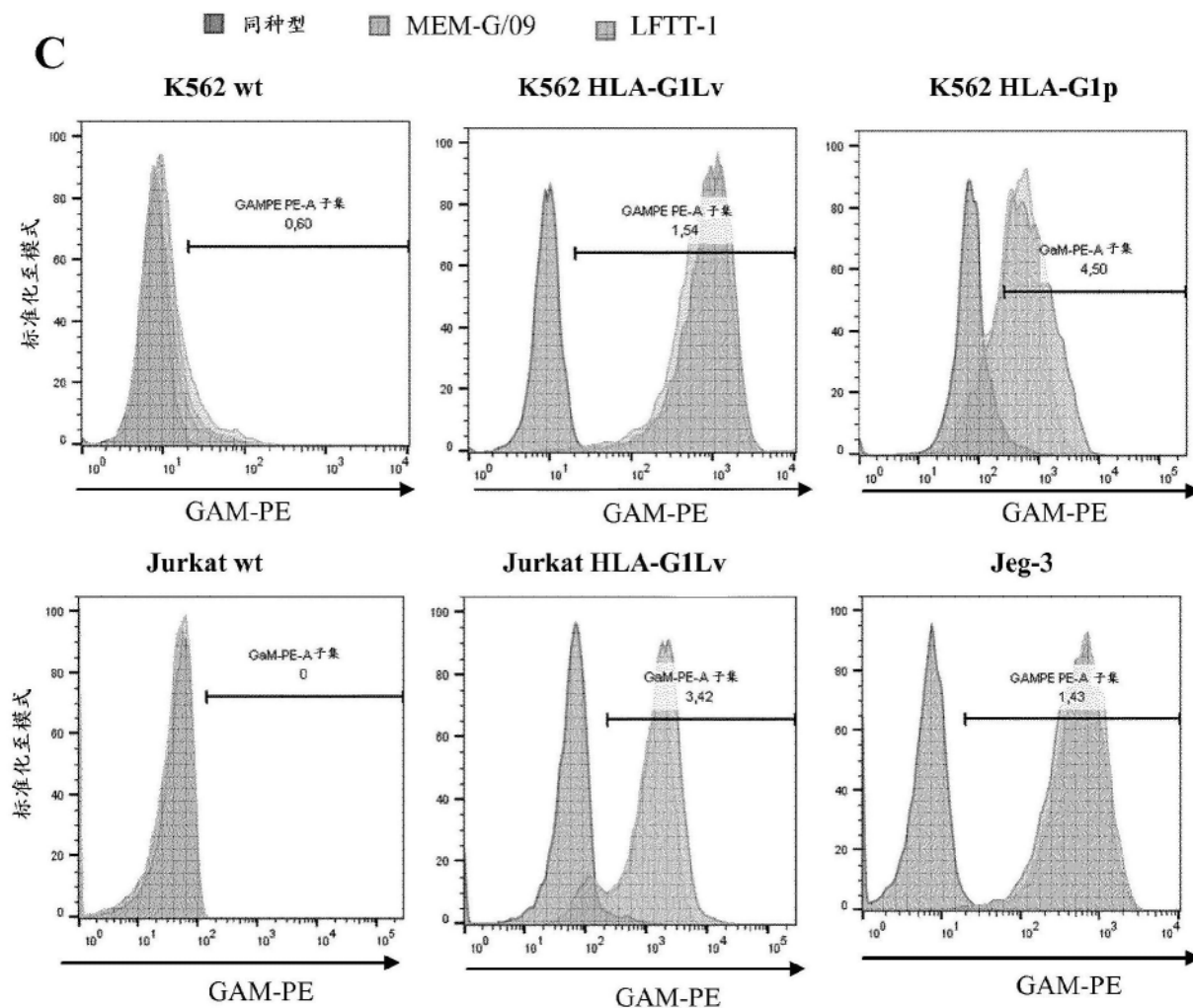


图2 (续)

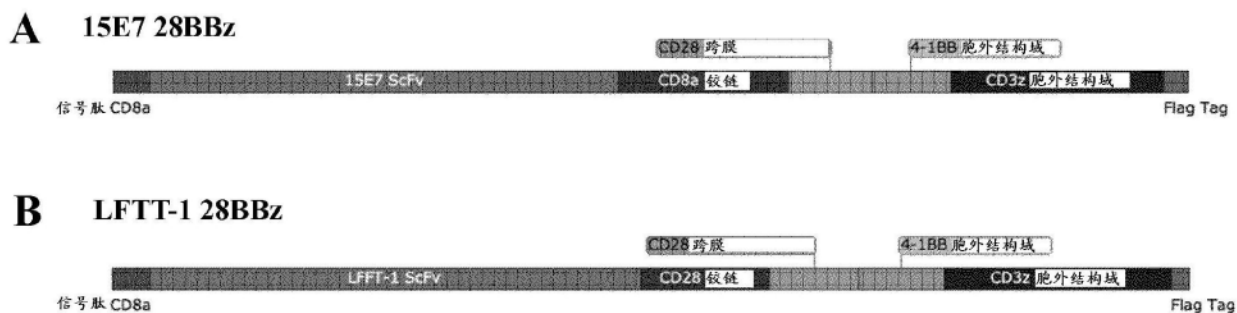


图3

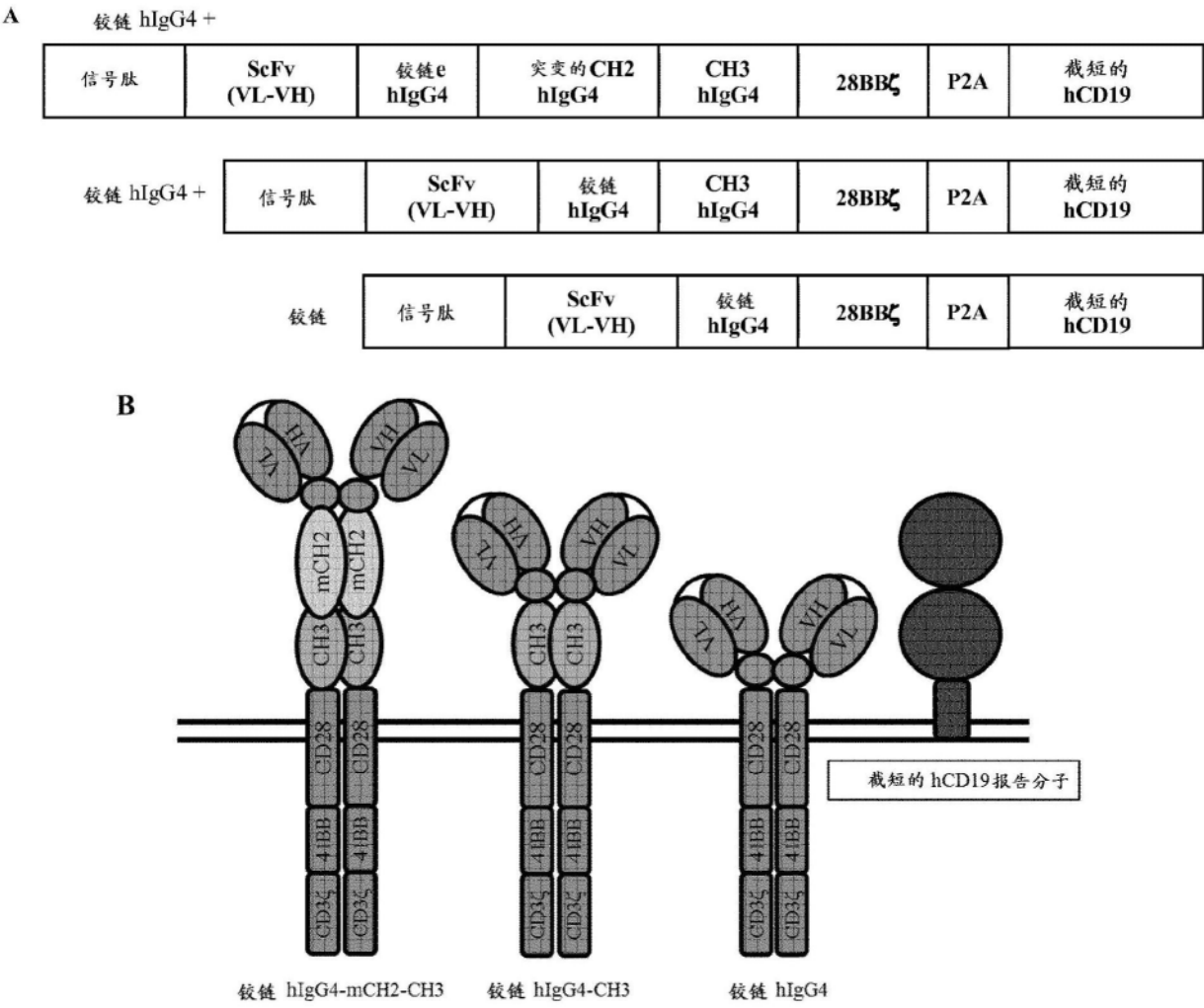


图4

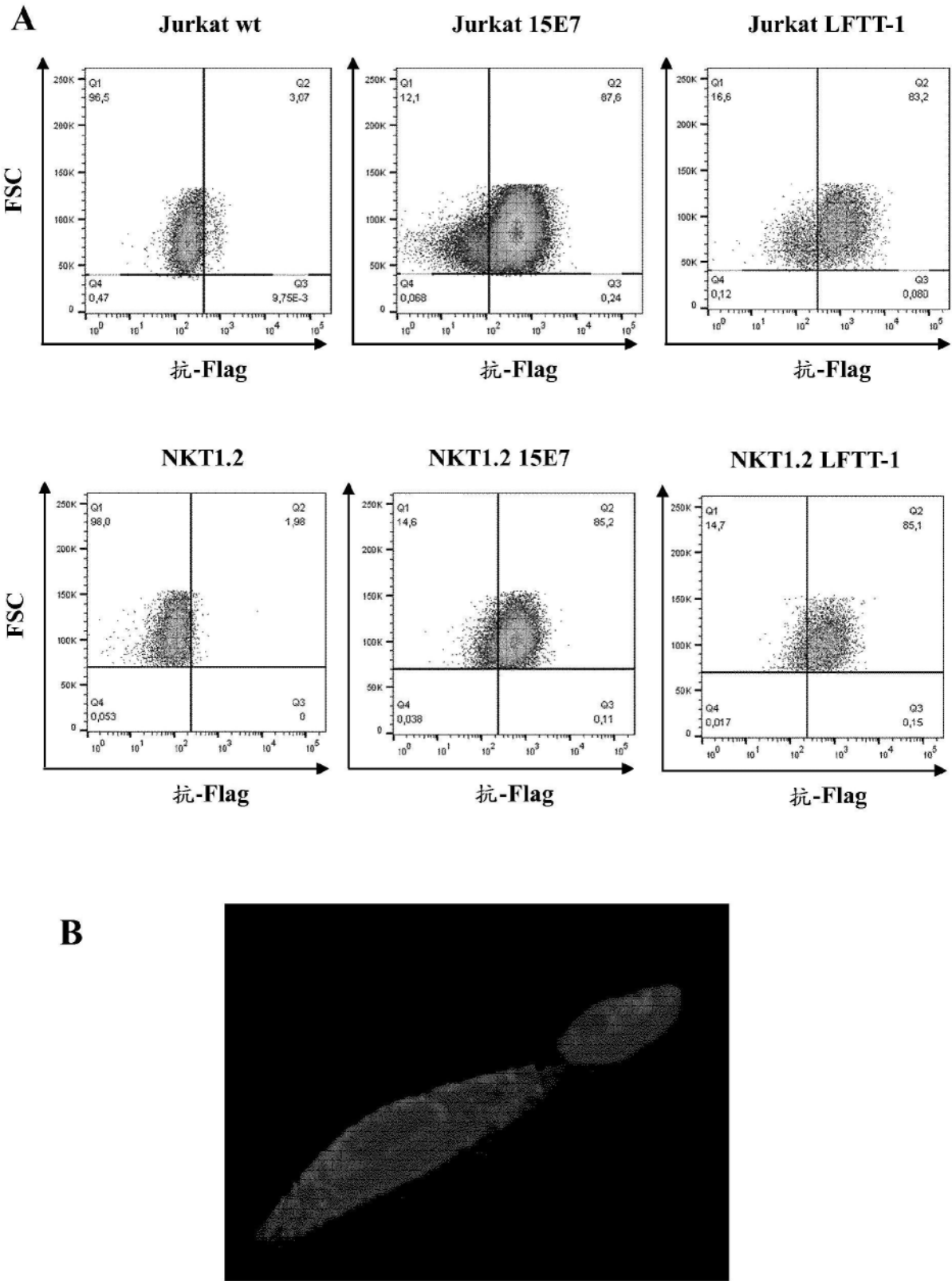


图5

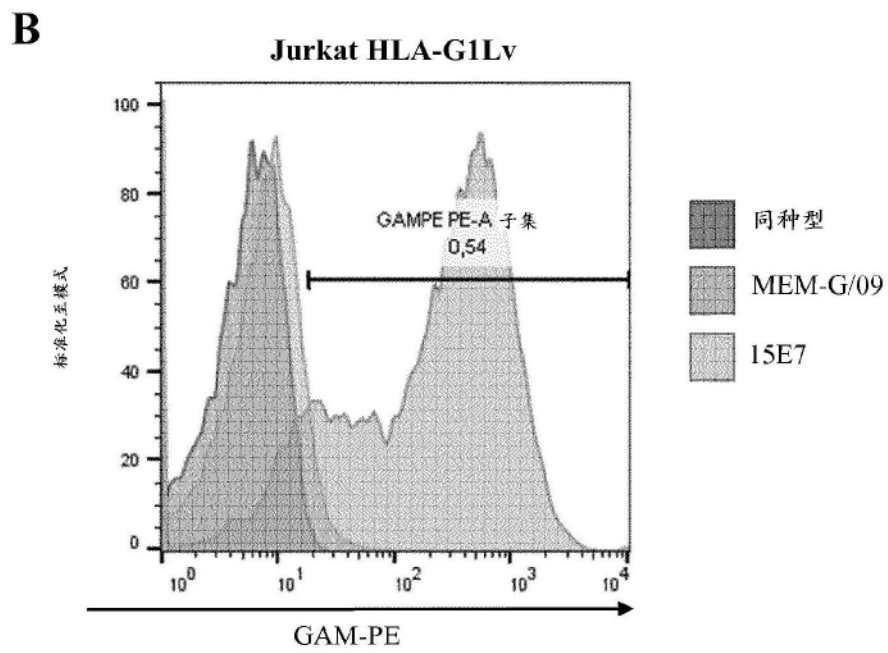
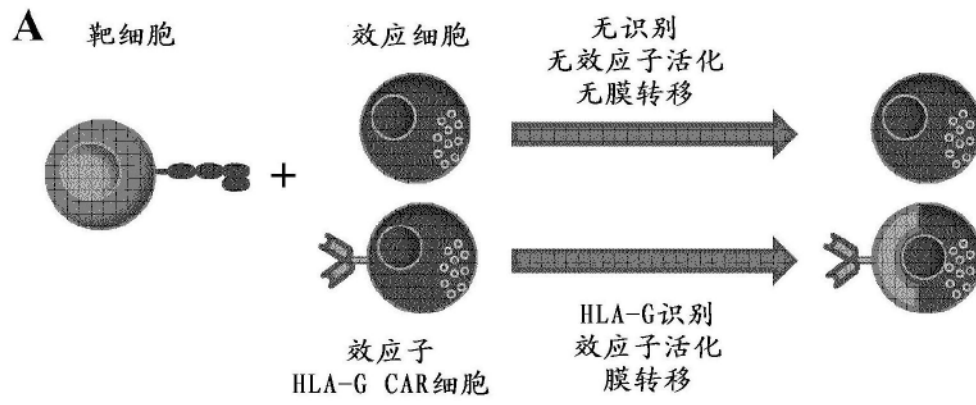


图6

C

1h 共孵育

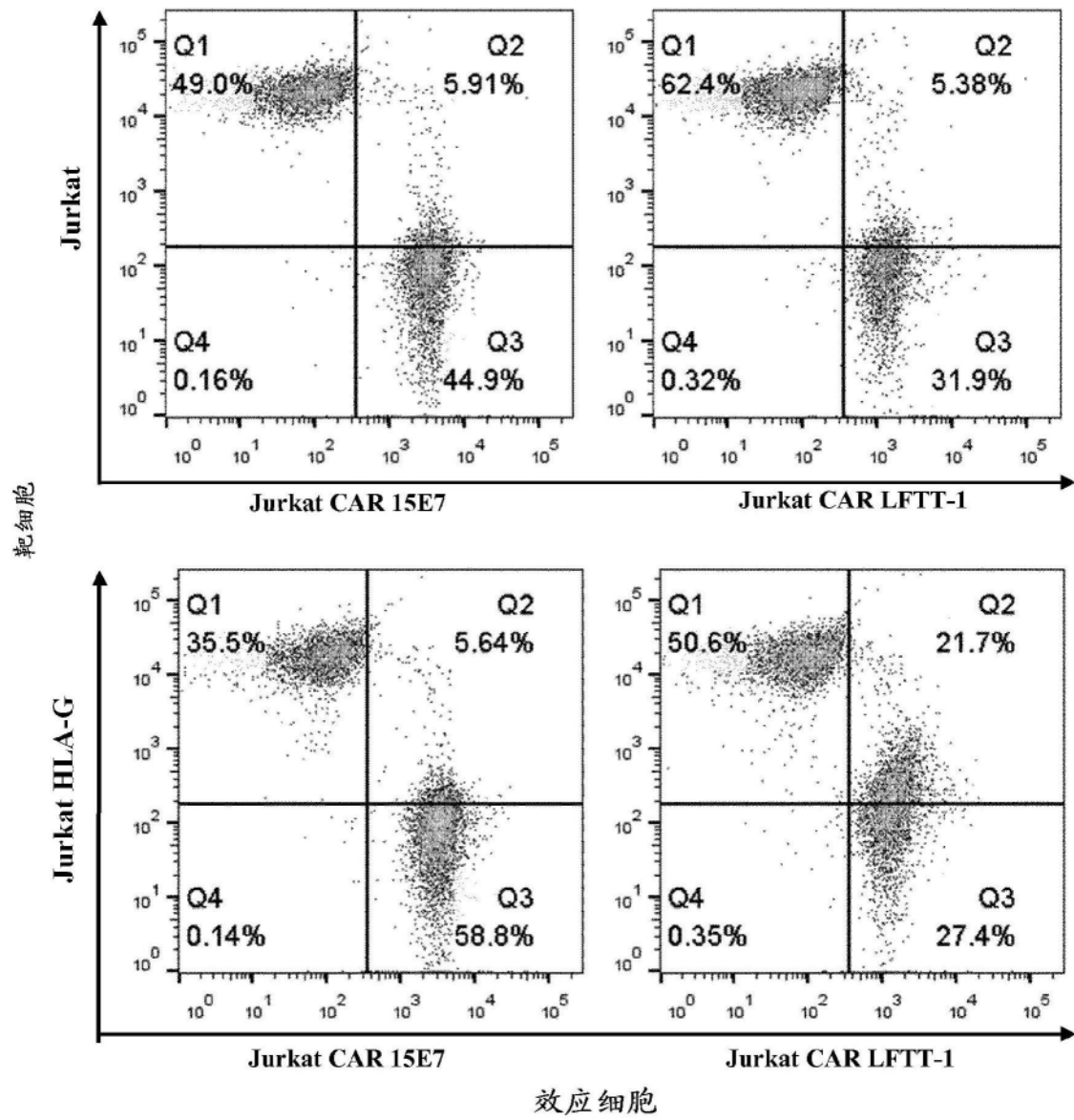


图6(续)

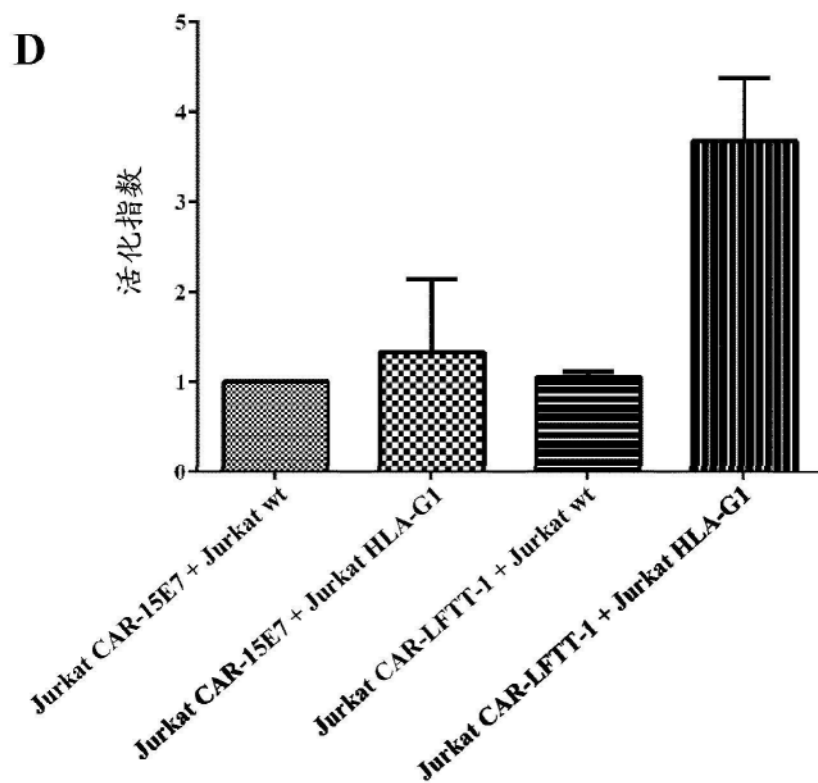


图6 (续)

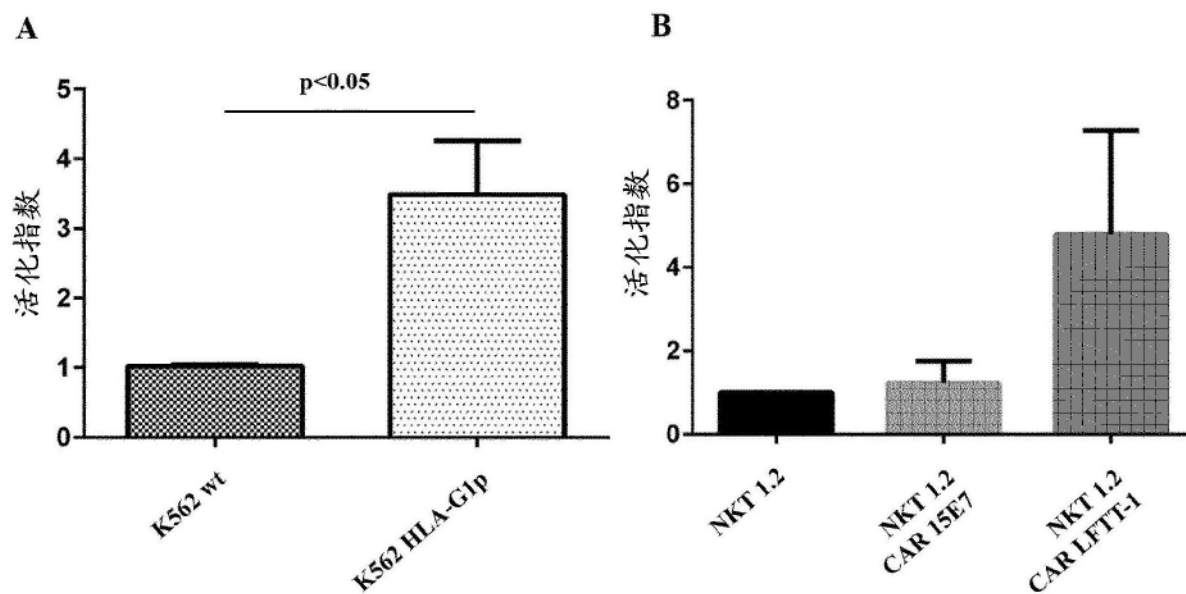


图7

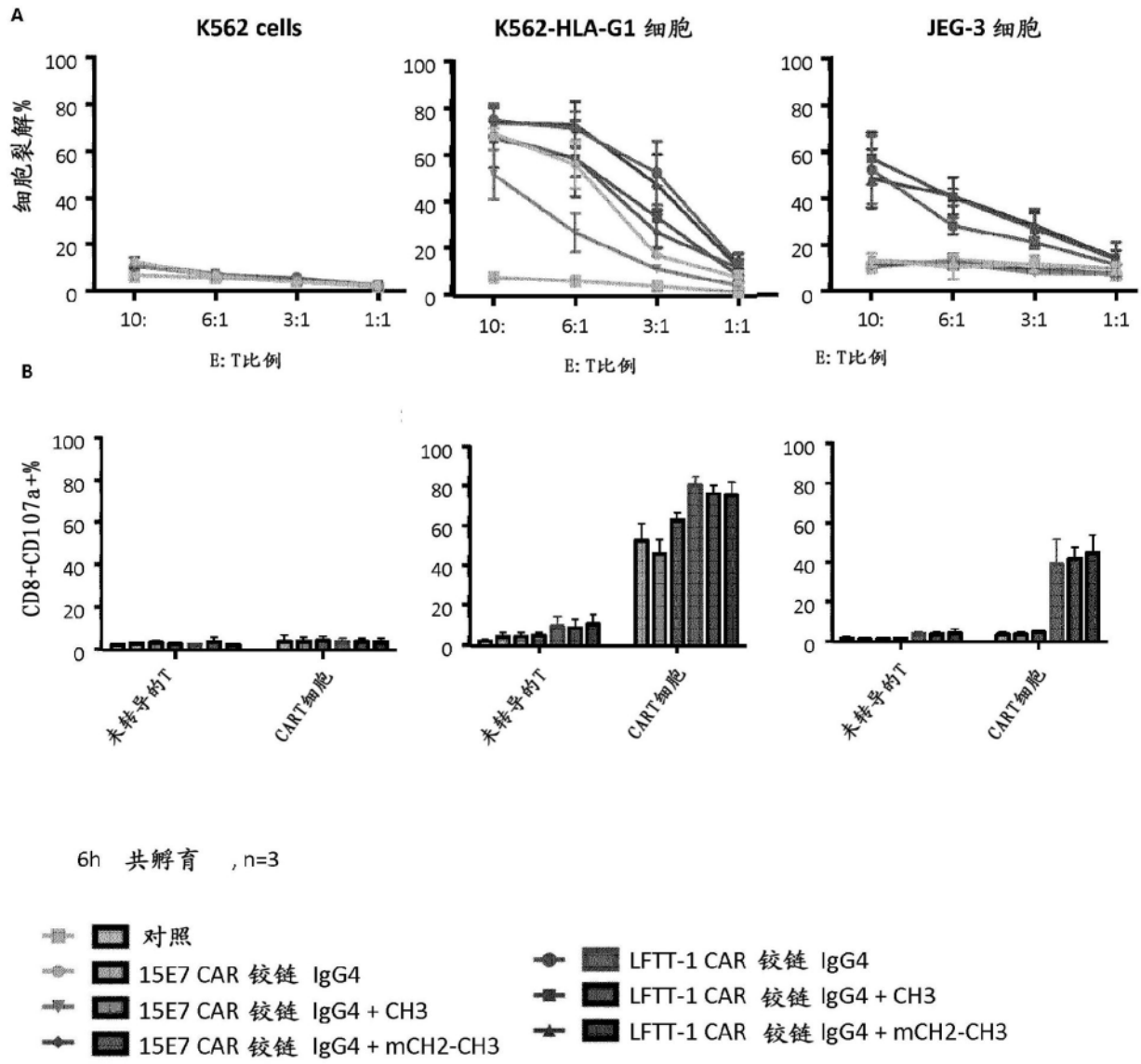


图8

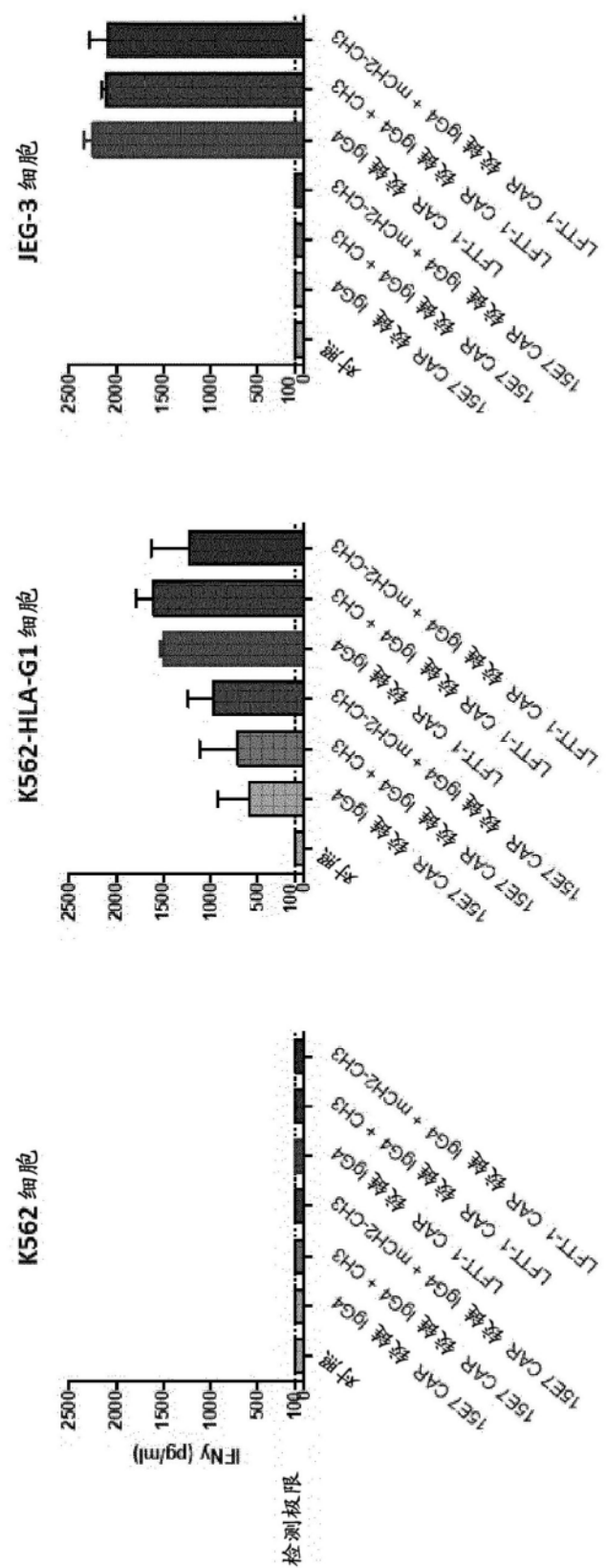


图9

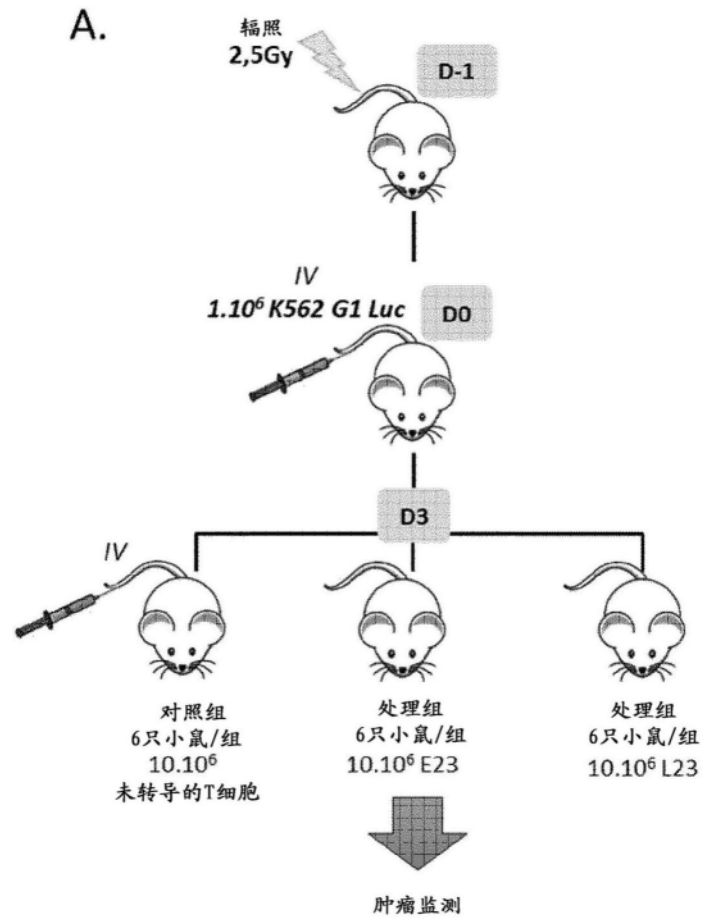


图10

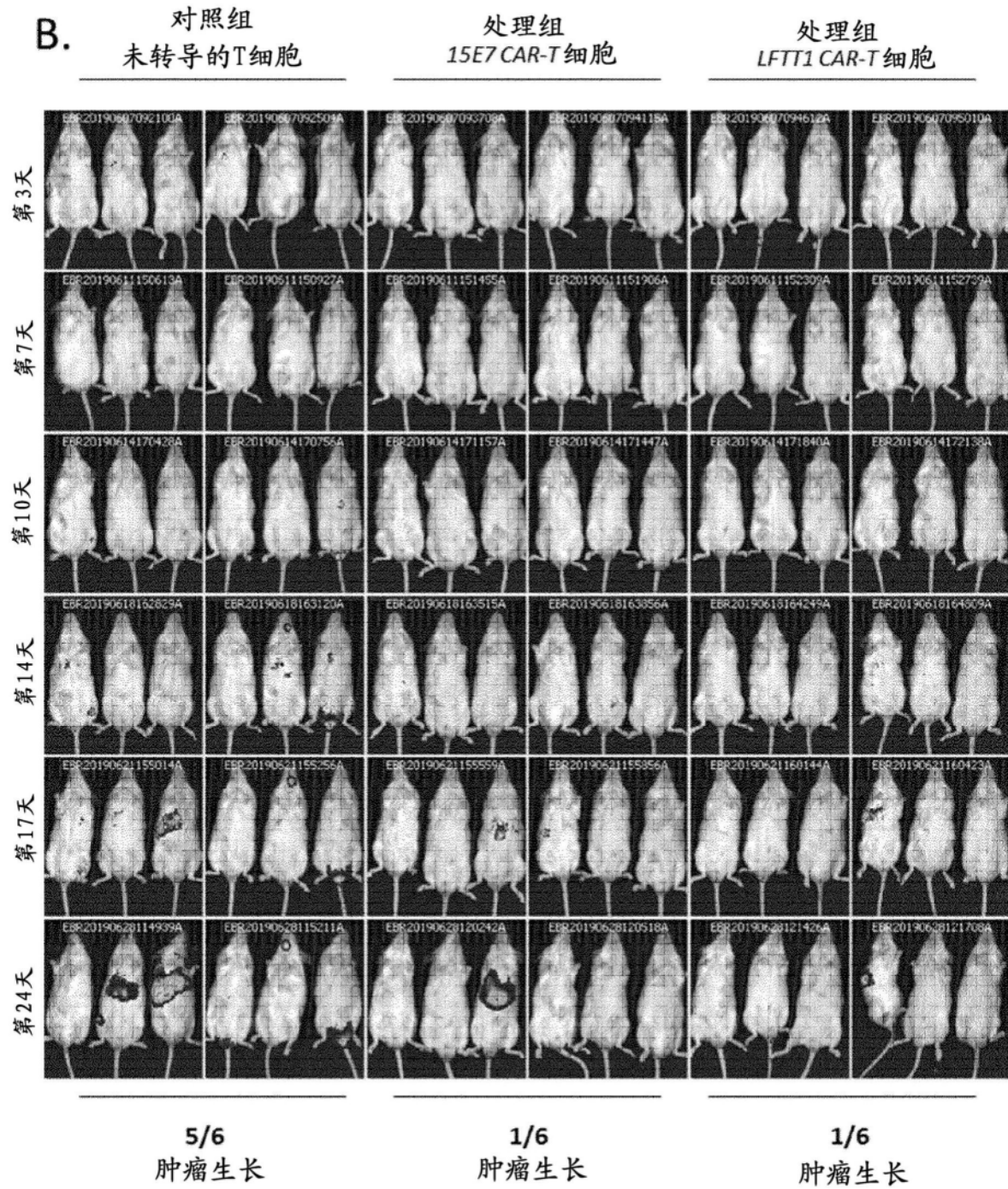


图10(续)