202237638

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202237638 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：110145784 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 12 月 08 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/725 (2006.01)* *C07K16/40 (2006.01)*
C07K16/18 (2006.01) *A61K35/17 (2015.01)*
A61K39/00 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/12/09 美國 63/123,331

(71)申請人：日商武田藥品工業股份有限公司 (日本) TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (JP)
日本

(72)發明人：沙畢羅 蓋瑞 SHAPIRO, GARY (US)；喬塔爾 裘哈拉 CHOUITAR, JOHARA (US)；何 星玥 HE, XINGYUE (US)；吳 羅莎 梅 NG, ROSA MEI (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：41 項 圖式數：18 共 308 頁

(54)名稱

烏苷酸環化酶C（ＧＣＣ）抗原結合劑之組成物及其使用方法

(57)摘要

本發明係揭示一種與鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合之抗原結合劑(例如單域抗體)，以及包含 GCC 抗原結合域的嵌合抗原受體。亦揭示包含該等抗原結合劑及其片段之核酸、重組表現載體、宿主細胞、抗原結合片段及醫藥組成物。本發明亦提供利用本文所提供之抗體及抗原結合分子之治療方法。

Antigen binding agents (e.g., single domain antibodies) that bind guanylyl cyclase C (GCC) and chimeric antigen receptors comprising GCC antigen binding domains are disclosed. Nucleic acids, recombinant expression vectors, host cells, antigen binding fragments, and pharmaceutical compositions comprising these antigen binding agents and fragments thereof are also disclosed. The invention also provides therapeutic methods for utilizing the antibodies and antigen-binding molecules are provided herein.

指定代表圖：



【圖 1A】

20223033
202257058
專利案號：110145784

【發明摘要】

【中文發明名稱】　鳥苷酸環化酶C (GCC)抗原結合劑之組成物及其使用方法

【英文發明名稱】　Compositions of Guanylyl Cyclase C (GCC) Antigen Binding Agents and Methods of Use Thereof

【中文】

本發明係揭示一種與鳥苷酸環化酶C (GCC)結合之抗原結合劑(例如單域抗體)，以及包含GCC抗原結合域的嵌合抗原受體。亦揭示包含該等抗原結合劑及其片段之核酸、重組表現載體、宿主細胞、抗原結合片段及醫藥組成物。本發明亦提供利用本文所提供之抗體及抗原結合分子之治療方法。

【英文】

Antigen binding agents (e.g., single domain antibodies) that bind guanylyl cyclase C (GCC) and chimeric antigen receptors comprising GCC antigen binding domains are disclosed. Nucleic acids, recombinant expression vectors, host cells, antigen binding fragments, and pharmaceutical compositions comprising these antigen binding agents and fragments thereof are also disclosed. The invention also provides therapeutic methods for utilizing the antibodies and antigen-binding molecules are provided herein.

【指定代表圖】　圖1A

【代表圖之符號簡單說明】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　鳥苷酸環化酶C (GCC)抗原結合劑之組成物及其使用方法

【英文發明名稱】　Compositions of Guanylyl Cyclase C (GCC) Antigen Binding Agents and Methods of Use Thereof

【技術領域】

無

【先前技術】

【0001】　鳥苷酸環化酶 C (GCC)為一種跨膜細胞表面受體，其功能為維持腸液、電解質體內平衡及細胞增殖，請參見例如 Carrithers 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3018-3020 (2003)。GCC 表現於小腸、大腸和直腸內襯的黏膜細胞(Carriters 等人，Dis Colon Rectum 39： 171-181 (1996))。GCC 的表現在腸上皮細胞腫瘤轉型之後仍維持，且表現在所有原發性及轉移性大腸直腸腫瘤中(Carriters 等人，Dis Colon Rectum 39： 171-181 (1996)；Buc 等人，Eur J Cancer 41： 1618-1627 (2005)；Carrithers 等人，Genterology 107： 1653-1661 (1994))。目前需要新穎且增進的標靶 GCC 之方法。

【發明內容】

【0002】　GCC 訊息傳遞途徑中斷與多種胃腸道疾病(包括大腸直腸癌)有關。除其它事項外，本發明提供一種新穎之抗 GCC 抗原結合分子(例如，單域抗體(sdAb))和嵌合抗原受體(CAR)，其包括抗 GCC 抗原結合域(如 sdAb)。此外，本發明提供表現 CAR 的宿主細胞(例如 T 細胞)，以及編碼該 CAR 或抗 GCC 抗原結合分子的核酸分子。該 CAR 細胞包含一表現於該細胞表面上之抗 GCC CAR

分子。在一些實施例中，該 CAR 在經轉導 T 細胞上展現高表面表現，在體內具有高度細胞溶解及轉導 T 細胞擴增及持續性。亦提供使用所揭示之 CAR、宿主細胞及核酸分子，以例如在個體中治療癌症之方法。

【0003】 在一態樣中，本發明提供一種抗鳥苷酸環化酶 C (GCC)嵌合抗原受體(CAR)，其包含一與鳥苷酸環化酶C (GCC)結合之細胞外抗原結合域、一跨膜域及至少一細胞內信號傳導域。

【0004】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一抗原結合域，其包含：一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8) 、 RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11) 和 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9) 、 KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12)和 DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10) 、 KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14)和 DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19)；或一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)。

【0005】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 之抗原結合域包含一重鏈可變區(VH)，其與 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 20 至少 90%一致。

【0006】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 之抗原結合域包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 21 至少 90%一致的胺基酸序列；一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 26 至少 90%一致的胺基酸序列；一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 27 至少 90%

一致的胺基酸序列；一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 28 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0007】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 之抗原結合域包含一僅具抗 GCC 抗原結合域之免疫球蛋白可變重鏈。

【0008】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 之細胞外抗 GCC 抗原結合域前接有一編碼前導胜肽之前導核苷酸序列。

【0009】 在一些實施例中，該前導胜肽包含 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、或 SEQ ID NO: 42。

【0010】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 更包含一鉸鏈域。

【0011】 在一些實施例中，該鉸鏈域包含一 CD28 之鉸鏈域。

【0012】 在一些實施例中，該 CD28 鉸鏈域包含 SEQ ID NO: 29。

【0013】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含與該跨膜域融合之鉸鏈域。

【0014】 在一些實施例中，該跨膜域包含一蛋白質跨膜域，該蛋白質選自於 T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD8、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD83、CD86、CD134、CD137、CD154、及 TNFRSF19、及其任一組合。

【0015】 在一些實施例中，該跨膜域包含一 CD28 跨膜域。

【0016】 在一些實施例中，該 CD28 跨膜域包含 SEQ ID NO: 30。

【0017】 在一些實施例中，該至少一細胞內信號傳導域包含一共刺激域和一初級信號傳導域。

【0018】 在一些實施例中，該共刺激結構域包含 OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12、和 4-1BB (CD137)、或其任一組合的功能性信號傳導域。

【0019】 在一些實施例中，該共刺激域包含一 CD28 的功能性信號傳導域。

【0020】 在一些實施例中，該 CD28 共刺激結構域包含 SEQ ID NO: 32。

【0021】 在一些實施例中，該初級信號傳導域包含 CD3ζ 信號傳導域。

【0022】 在一些實施例中，該 CD3ζ 信號傳導域包含 SEQ ID NO: 33。

【0023】 在一態樣中，抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其選自由以下組成之組：SEQ ID NO: 47-52。

【0024】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 47 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 48 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 49 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 50 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 51 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 52 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0025】 於一態樣中，本發明提供一種編碼本文所述之抗 GCC CAR 之經分離聚核甘酸。

【0026】 於一些實施例中，本文中所述之編碼抗 GCC CAR 之經分離聚核甘酸更包含經截短之表皮生長因子受體(tEGFR)序列。

【0027】 在一些實施例中，該 tEGFR 包含一核苷酸序列，其編碼與 SEQ ID NO: 43 至少 95%、96%、97%、98%、99%一致的胺基酸序列。

【0028】 在一些實施例中，該 tEGFR 包含一核苷酸序列，其編碼與 SEQ ID NO: 43 一致的胺基酸序列。

【0029】 在一些實施例中，該編碼本文所述之抗 GCC CAR 之經分離聚核甘酸更包含一弗林蛋白酶識別位點和下游 2A 自裂解胜肽序列，設計用於該標籤

序列和 CAR 序列的同時雙順反子表現。

【0030】 在一些實施例中，該 2A 自裂解胜肽係選自於 F2A、P2A、E2A 及 T2A。

【0031】 在一些實施例中，該 2A 自裂解胜肽為 P2A。

【0032】 在一態樣中，本發明提供一種載體，其包含編碼本文所述之抗 GCC CAR 之經分離聚核甘酸。

【0033】 在一些實施例中，載體為腺病毒載體、腺病毒相關載體、DNA 載體、慢病毒載體、質體、逆轉錄病毒載體或 RNA 載體。在一些實施例中，該載體為逆轉錄病毒載體。

【0034】 在一態樣中，本發明提供一種細胞，其包含編碼本文所述之抗 GCC CAR 之經分離聚核甘酸。

【0035】 在一些實施例中，該細胞表現本文所描述之抗 GCC CAR。

【0036】 在一些實施例中，該細胞為 T 細胞、同種異體 T 細胞、自體 T 細胞或腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。

【0037】 在一態樣中，本發明提供一種醫藥組成物，其包含表現或可表現本文所描述之抗 GCC CAR 的細胞群。在一些實施例中，該醫藥組成物包含一細胞群，其中該群體中大於 70%、80%、90%或 95%的細胞表現該抗 GCC CAR。

【0038】 在一態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其包含向有需要治療之個體投與包含本文所述之抗 GCC CAR 之醫藥組成物。

【0039】 在一些實施例中，該癌症係選自於胃腸癌、大腸直腸癌、大腸直腸腺癌、大腸直腸平滑肌肉瘤、大腸直腸淋巴瘤、大腸直腸黑色素瘤、大腸直腸神經內分泌腫瘤、轉移性大腸癌、胃癌、胃腺癌、胃淋巴瘤、胃肉瘤、食道癌、鱗狀細胞癌、食道腺癌或胰臟癌。

【0040】 在一些實施例中，該癌症為胃腸癌。

【0041】 在一些實施例中，該胃腸癌為大腸癌、大腸直腸癌、胃癌或食道癌。

【0042】 在一態樣中，本發明提供一種藉由投與包含本文所描述之抗 GCC CAR 之醫藥組成物，以降低腫瘤生長或腫瘤大小之方法。

【0043】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8)、RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11)和 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16)。

【0044】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9)、KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12)和 DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17)。

【0045】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)。

【0046】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14)和 DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19)。

【0047】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)。

【0048】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 20 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0049】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 21 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0050】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 26 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0051】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 27 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0052】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 28 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0053】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 20 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0054】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 21 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0055】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 26 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0056】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 27 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0057】 在一態樣中，本發明提供一種鳥苷酸環化酶 C (GCC)結合劑，其包含一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 28 至少 90%一致的胺基酸序列。

【0058】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑包含一 VH 區，其包含一與 SEQ ID NO: 1、20、21、26、27 或 28 之任一項至少 95%一致之胺基酸序列。

【0059】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑包含一 VH 區，其包含一與 SEQ ID NO: 1、20、21、26、27 或 28 之任一項一致之胺基酸序列。

【0060】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑係選自於由以下組成之群：IgA 抗

體、IgG 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、雙或多特異性抗體、Fab 片段、Fab'片段、F(ab')2 片段、Fd'片段、Fd 片段、經分離之 CDR 或其群組；單鏈可變異片段(scFv)、多胜肽-Fc 融合物、單域抗體(sdAb)、VH、駱駝源化抗體；掩蔽抗體、小型模組化免疫製藥(「SMIPsTM」)、單鏈、串聯雙價抗體、VHHs、抗運載蛋白(Anticalin)、奈米抗體、人源化抗體(humabody)、微型抗體、BiTE、錨蛋白(ankyrin)重複蛋白、DARPIN、Avimer、DART、TCR-類似抗體、Adnectin、人類泛素(Affilin)、穿透抗體(Trans-body)；親和抗體(Affibody)、TrimerX、微型蛋白、Fynomer、Centyrin；以及 KALBITOR。

【0061】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑為單域抗體(sdAb)。

【0062】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑為僅具一重鏈(VH)之抗體。

【0063】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑係以介於約 0.3 奈米莫耳濃度(nM)至約 10 nM 之間的 KD 與 GCC 結合。

【0064】 在一些實施例中，該 GCC 結合劑係以介於約 0.5 nM 至約 8 nM 之間的 EC50 與標靶細胞上的 GCC 結合。

【0065】 在一態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其包含向需要治療之個體投與本文所述之 GCC 結合劑。

【0066】 在一些實施例中，該癌症係選自於胃腸癌、大腸直腸癌、大腸直腸腺癌、大腸直腸平滑肌肉瘤、大腸直腸淋巴瘤、大腸直腸黑色素瘤、大腸直腸神經內分泌腫瘤、轉移性大腸癌、胃癌、胃腺癌、胃淋巴瘤、胃肉瘤、食道癌、鱗狀細胞癌、食道腺癌或胰臟癌。

【0067】 在一些實施例中，該癌症為胃腸癌。

【0068】 在一些實施例中，該胃腸癌為大腸癌、大腸直腸癌、胃癌或食道癌。

【0069】 在一態樣中，本發明提供一種醫藥組成物，其包含 GCC 結合劑及醫藥學上可接受之載體，其中該 GCC結合劑包含：一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8)、RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11) 和 DRSTGWSEWNSDL

(HCDR3) (SEQ ID NO: 16)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9)、KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12)和 DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14)和 DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19)；或一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)。

【0070】 在一態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其包含向需要治療之個體投與 GCC 結合劑，其中該 GCC 結合劑包含：一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8)、RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11)和 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9)、KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12)和 DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)；一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14)和 DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19)；或一重鏈可變區(VH)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)。

【0071】　在一態樣中，本發明提供一種核酸，其編碼與 SEQ ID NO: 1、20、21、26、27 或 28 之任一者一致的 VH 胺基酸序列。

【0072】　在一態樣中，本發明提供一種載體，其包含編碼與 SEQ ID NO: 1、20、21、26、27 或 28 之任一者一致的 VH 胺基酸序列之核酸。

【0073】　在一態樣中，本發明提供一種經分離之細胞，其包含有包含編碼與 SEQ ID NO: 1、20、21、26、27 或 28 之任一者之 VH 胺基酸序列的核酸之載體。

【0074】　應理解，前述一般描述及以下詳細描述二者僅為例示性及解釋性，且不限制本發明，如所申明者。

【圖式簡單說明】

【0075】　本文所含之圖式，其由以下各圖組成，僅用於說明目的而非限制。

【0076】　***圖 1A 及 1B*** 描繪例示性嵌合抗原受體(CAR)構築體。

【0077】　***圖 2A-2D*** 顯示使用四種腫瘤細胞株進行之例示性抗 GCC CAR-T 體外細胞毒性試驗。HT29-GCC 細胞(一種經改造以穩定表現 GCC 之人類大腸直腸癌細胞株 HT29)(圖 2A)；HT29-VEC(載體對照組 GCC 陰性細胞株)(圖 2B)；及兩種內源性表現 GCC 之腫瘤細胞株：GSU (圖 2C)和 LS1034 (圖 2D)。長條代表來自三次技術重複的平均值+SD 值。數據代表來自>3 個供體的抗 GCC CAR T 細胞進行的>3 個獨立實驗。CAR T 細胞毒性係於截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0078】　***圖 3A-3D*** 顯示使用四種腫瘤細胞株進行之例示性抗 GCC CAR-T 體外細胞毒性試驗。HT29-GCC 細胞(一種經改造以穩定表現 GCC 之人類大腸直腸癌細胞株 HT29)(圖 3A)；HT29-VEC(載體對照組 GCC 陰性細胞株)(圖 3B)；及兩種內源性表現 GCC 之腫瘤細胞株：GSU(圖 3C)和 LS1034(圖 3D)。長條代表來自三次技術重複的平均值+SD 值。各資料代表來自>3 個供體之使用抗 GCC CAR T 細胞進行的>3 個獨立實驗。CAR T 細胞毒性係於截短 EGFR (tEGFR)存

在的情況下測定。

【0079】 ***圖 4A-4D*** 顯示由與表現 GCC(HT29-GCC)(圖 4A)、GSU(圖 4C)、LS1034(圖 4D)及 GCC-陰性(HT29-VEC，圖 4B)之腫瘤細胞體外共培養之抗 GCC CAR-T 細胞分泌之例示性 IFN-g 細胞激素。上清液中之分泌 IFNg 係使用 Intellicyt QBeads Human PlexScreen 套組(Sartorius, 90702)測定。長條代表來自三次技術重複的平均值+SD 值。各數據代表來自>3 個供體之使用抗 GCC CAR T 細胞進行的>3 個獨立實驗。細胞激素分泌係於截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0080】 ***圖 5A-5D*** 顯示由與表現 GCC(HT29-GCC)(圖 5A)、GSU(圖 5C)、LS1034(圖 5D)及 GCC-陰性(HT29-VEC，圖 5B)之腫瘤細胞體外共培養之抗 GCC CAR-T 細胞分泌之例示性 IFN-g 細胞激素。上清液中之分泌 IFNg 係使用 Intellicyt QBeads Human PlexScreen 套組(Sartorius、90702)測定。長條代表來自三次技術重複的平均值+SD 值。各數據代表來自>3 個供體之使用抗 GCC CAR T 細胞進行的>3 個獨立實驗。細胞激素分泌係於截短 EGFR (tEGFR)存在的情況下測定。

【0081】 ***圖 6A-6D*** 顯示顯示由與表現 GCC(HT29-GCC)(圖 6A)、GSU(圖 6C)、LS1034(圖 6D)及 GCC-陰性(HT29-VEC，圖 6B)之腫瘤細胞體外共培養之抗 GCC CAR-T 細胞分泌之例示性 IL-2 細胞激素。上清液中之分泌 IFL-2 係使用 Intellicyt QBeads Human PlexScreen 套組(Sartorius, 90702)測定。長條代表來自三次技術重複的平均值+SD 值。各資料代表來自>3 個供體之使用抗 GCC CAR T 細胞進行的>3 個獨立實驗。細胞激素分泌係於截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0082】 ***圖 7A-7D*** 顯示由與表現 GCC(HT29-GCC)(圖 7A)、GSU(圖 7C)、LS1034(圖 7D)及 GCC-陰性(HT29-VEC，圖 7B)之腫瘤細胞體外共培養之抗 GCC CAR-T 細胞分泌之例示性 IL-2 細胞激素。上清液中之分泌 IFL-2 係使用 Intellicyt QBeads Human PlexScreen 套組(Sartorius, 90702)測定。長條代表來自三

次技術重複的平均值+SD 值。各資料代表來自>3 個供體之使用抗 GCC CAR T 細胞進行的>3 個獨立實驗。細胞激素分泌係於截短 EGFR (tEGFR)存在的情況下測定。

【0083】 ***圖 8A 及 8B*** 顯示以來自兩個不同健康供體 D393(圖 8A)及 D686(圖 8B)製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 HT55 模型(內源性表現 GCC 之大腸直腸癌，GCC H-分數=300/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(40 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0084】 ***圖 9A-9C*** 顯示以來自三個不同健康供體 D393 (圖 9A)、D797 (圖 9B)和 D954 (圖 9C)所製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 HT55 模型(內源性表現 GCC 之大腸直腸癌，GCC H-分數=300/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0085】 ***圖 10A-10C*** 顯示以來自三個不同健康供體 D393 (圖 10A)、D797 (圖 10B)和 D954 (圖 10C)製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 HT55 模型(內源性表現 GCC 之大腸直腸癌，GCC H-分數=300/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)存在的情況下測定。

【0086】 ***圖 11A-11C*** 顯示以來自三個不同健康供體 D393 (圖 11A)、D954 (圖 11B)和 D686 (圖 11C)製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 HT55 模型(內源性表現 GCC 之大腸直腸癌，GCC H-分數=300/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0087】 ***圖 12A-12C*** 顯示以來自三個不同健康供體 D393 (圖 12A)、D954 (圖 12B)和 D686 (圖 12C)製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 HT55 模型(內源性表現 GCC 之大腸直腸癌，GCC H-分數=300/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間

變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)存在的情況下測定。

【0088】 ***圖 13A 和 13B*** 顯示以來自兩個不同健康供體 D393(圖 13A)和 D954(圖 13B)製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 GSU 模型(內源性表現 GCC 之胃癌，GCC H-分數=170/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0089】 ***圖 14A 和 14B*** 顯示以來自兩個不同健康供體 D393(圖 14A)和 D954(圖 14B)製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 GSU 模型(內源性表現 GCC 之胃癌，GCC H-分數=170/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)存在的情況下測定。

【0090】 ***圖 15A-C*** 顯示以來自三個不同健康供體 D393 (圖 15A)、D954 (圖 15B)和 D686(圖 15C)製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 GSU 模型(內源性表現 GCC 之胃癌，GCC H-分數=170/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0091】 ***圖 16A-C*** 顯示以來自三個不同健康供體 D393 (圖 16A)、D954 (圖 16B)和 D686(圖 16C)製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 GSU 模型(內源性表現 GCC 之胃癌，GCC H-分數=170/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0092】 ***圖 17*** 顯示以來自一個健康供體製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 LS1034 模型(內源性表現 GCC 之大腸直腸癌，GCC H-分數=300/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)不存在的情況下測定。

【0093】 ***圖 18*** 顯示以來自一個健康供體製造之抗 GCC CAR-T 細胞處理之 LS1034 模型(內源性表現 GCC 之大腸直腸癌，GCC H-分數=300/300)中，平均腫瘤體積變化(mm^3)隨時間變化(42 天)的例示性抗腫瘤作用結果。抗腫瘤作用係於該截短 EGFR (tEGFR)存在的情況下測定。

【實施方式】

相關申請案之交互參考

【0094】 本申請案主張 2020 年 12 月 9 日申請之美國臨時專利申請案第 63/123,331 號之優先權，其以全文引用之方式併入本文中。

序列表

【0095】 本申請案含有序列表，其已以 ASCII 格式之電子方式提交，且以全文引用之方式併入本文中。該 ASCII 複本於 2021 年 11 月 19 日建立，命名為 MIL-005WO_SL.txt，其大小為 140,478 位元組。

定義

【0096】 為使本發明更易於理解，首先在下文定義某些術語。隨附術語及其他術語之額外定義貫穿本說明書記載。

【0097】 除非上下文另外明確指示，否則如本說明書及所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個指示物。因此，例如，提及「方法」包括一或多種方法，及/或本文所述類型之步驟，及/或熟習此項技術者將經由閱讀本發明及類似者時，變得顯而易見。

【0098】 ***投與***：如本文所用，向個體「投與」組成物係指提供、施用或使該組成物與該個體接觸。投與可藉由多種途徑中之任一者實現，諸如局部、口服、皮下、肌肉內、腹膜內、靜脈內、脊髓鞘內和皮內。

【0099】 ***親和力***：如本文中所使用，術語「親和力」係指結合部分(例如，抗原結合劑(例如，本文所述之可變域)與標靶(例如，抗原(例如 GCC))之間的結合交互作用特性，且指示出該結合交互作用之強度。在一些實施例中，親和力

之測量係以解離常數(K_D)表示。在一些實施例中，結合部分對於標靶具有高親和力(例如，小於約 10^{-7} M、小於約 10^{-8} M 或小於約 10^{-9} M 之 K_D)。在一些實施例中，結合部分對於標靶具有低親和力(例如，高於約 10^{-7} M、高於約 10^{-6} M、高於約 10^{-5} M、或高於約 10^{-4} M 之 K_D)。

【0100】 ***動物***：如本文所使用之術語「動物」係指動物界之任何成員。在一些實施例中，「動物」係指處於發育之任何階段之人類。在一些實施例中，「動物」係指處於發育之任何階段之非人類動物。在某些實施例中，該非人類動物為哺乳動物(例如嚙齒動物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、貓、綿羊、牛、靈長類動物及/或豬)。在一些實施例中，動物包括但不限於哺乳動物、鳥、爬蟲類、兩棲動物、魚、昆蟲及/或蟲。在一些實施例中，動物可為基因轉殖動物、經基因工程改造之動物及/或純系。

【0101】 ***自體***：如本文所用，術語「自體」是指衍生自同一個體的任何材料，隨後將其重新引入該個體。

【0102】 ***同種異體***：「同種異體」係指衍生自一個體的材料被投與不同的個體或個體群。

【0103】 ***抗體或抗原結合劑：***如本文所用，術語「抗體」或「抗原結合劑」係指包括足以賦予特定標靶抗原的特異性結合之典型免疫球蛋白序列元件之多胜肽。熟習此項技術者將瞭解，該術語可在本文中互換使用。在一些實施例中，如本文中所使用，術語「抗體」或「抗原結合劑」亦指「抗體片段」或「抗體片段群」或「抗原結合部分」，其包括完整抗體之一部分，例如，例如抗體之抗原結合或可變區。「抗體片段」之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')2 及 Fv 片段；三抗體；四抗體；直線形抗體；單鏈抗體分子；以及由抗體片段形成之多特異性抗體中所包括之含 CDR 部分。熟習此項技術者應瞭解，術語「抗體片段」並不暗示且不限於任何特定產生模式。抗體片段可經由使用任何適當方法學製備，包括但不限於完整抗體的裂解、化學合成、重組製造等。如本領域中已知的，天然製造之完整抗體為約 150 kD 之四聚體試劑，包含兩個相同的重鏈多肽(各

約 50 kD)及兩個相同的輕鏈多肽(各約 25 kD)相互結合形成所謂的「Y 形」結構。各重鏈包含至少四個域(每個約 110 個胺基酸長)- 一個胺基端可變(V_H)域(位於 Y 結構之頂端)，接著是三個恒定域：C_H1、C_H2 和羧基端 C_H3(位於 Y 型主幹的底部)。短區(稱為「開關」)連接該重鏈可變區及恆定區。「鉸鏈」將 C_H2 及 C_H3 域連接至該抗體之其餘部分。此鉸鏈區中的兩個雙硫鍵將完整抗體中的兩個重鏈多肽彼此連接。各輕鏈包含兩個域 - 胺基端可變(V_L)域，之後接著一個羧基端恆定(C_L)域，彼此以另一「開關」隔開。完整抗體四聚體是由兩個重鏈-輕鏈二聚體組成，其中重鏈及輕鏈藉由單一雙硫鍵彼此連接；兩個其他雙硫鍵將該重鏈鉸鏈區彼此連接，使得該二聚體彼此連接且形成四聚體。天然生成的抗體亦經醣基化，一般在 C_H2 域上。天然抗體中的每個域都具有以「免疫球蛋白折疊」為特徵的結構，該折疊由兩個 β 摺板(例如，3-、4-或 5-股摺板)，在壓縮的反向平行 β 桶中相互堆積而成。每個可變域包含三個高度變異環，稱為「互補決定區」(CDR1、CDR2 和 CDR3)和四個稍微不變的「框架」區(FR1、FR2、FR3 和 FR4)。當天然抗體折疊時，FR 區形成 β 摺板，為域提供結構框架，而來自重鏈和輕鏈二者的 CDR 環區在三維空間中聚集在一起，因而在該 Y 結構的頂端創造出單一高度變異抗原結合位點。抗體多肽鏈之間的胺基酸序列比對已定義出兩種輕鏈(κ 和 λ)類別、數種重鏈(如 μ、γ、α、ε、δ)類別，以及數種重鏈亞群(α1、α2、γ1、γ2、γ3 和 γ4)。抗體類別(IgA [包括 IgA1、IgA2]、IgD、IgE、IgG [包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4]和 IgM)是基於所使用的重鏈序列的類別而定義的。

【0104】 出於本發明的目的，在某些實施例中，包括在天然抗體中發現的足夠免疫球蛋白域序列的任何多肽或多肽複合物，可被稱為及/或作為「抗體」或「抗原結合劑」，不論此種多肽是天然產生的(例如，由對某一抗原產生反應的生物體產生)，或藉由重組工程、化學合成或其他人工系統或方法學產生。在一些實施例中，抗體為單株抗體；在一些實施例中，抗體為多株抗體。在一些實施例中，抗體具有小鼠、兔子、靈長類動物或人類抗體特徵的恆定區序列。在

一些實施例中，如本領域中已知的，抗體序列元件為人類化、靈長類化、嵌合化等。此外，本文使用的術語「抗體」或「抗原結合劑」將被理解為涵蓋(除非內文另有說明或澄清)在適當的實施例中，可以指任何本領域已知的或已開發的構建體或形式，用於在替代呈現中捕捉抗體結構性和功能性特徵。舉例而言，在一些實施例中，該等術語可指稱雙-或其它多-特異性(例如，酶親體等)抗體、小型模組免疫藥物(「SMIPs™」)、單鏈抗體、駱駝源化抗體及/或抗體片段。在一些實施例中，抗體可能缺乏它在天然產生時可能具有的共價修飾(例如，連接聚醣)。在一些實施例中，抗體可包含共價修飾(例如，連接聚醣、負載[例如可偵測部分、治療部分、催化部分等]、或其他側接基[例如聚乙二醇等])。

【0105】 ***大約或約***：如本文所使用，術語「大約」或者「約」如應用於有興趣的一或者多個數值，係指類似於所陳述參考值之數值。在某些實施例中，除非另外說明或者另外自內文顯而易見，否則術語「大約」或者「約」係指在任一方向上(大於或者小於)落於所陳述參考值之 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或者更小之數值範圍內(但此數值將超出可能性值之 100%的情況除外)。

【0106】 ***互補決定區(CDR)***：可變域的「CDR」為在可變區內，根據 Kabat、Chothia 之定義、Kabat 和 Chothia 二者之累積、AbM、接觸及/或構型定義或任何本領域中所周知的 CDR 測定方法所辨識出的胺基酸殘基。抗體 CDR 可辨識為最初由 Kabat 等人定義的高度變異區。請參見，例如，Kabat 等人，1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，公共衛生服務處，NIH, Washington D.C。CDR 的位置亦可辨識為最初由 Chothia 和其他人描述的結構環結構。請見如 Chothia 等人，Nature 342:877-883, 1989。其他的 CDR 辨識方法包括「AbM 定義」，此為 Kabat 和 Chothia 之間的折衷，是使用 Oxford Molecular 的 AbM 抗體模擬軟體(現在名為 Accelrys®)推導而來，或基於觀察到的抗原接觸的 CDR 之「接觸定義」，如 MacCallum 等人，J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996

中所述。在另一方法中，在本文中稱為 CDR 的「構型定義」，該 CDR 的位置可辨識為對抗原結合做出焓貢獻的殘基。請參照如 Makabe 等人，Journal of Biological Chemistry, 283: 1 156-1166, 2008。尚有其他 CDR 邊界定義可能不嚴格遵循上述方法之一，但仍將與至少一部分的 Kabat CDR 重疊，儘管根據特定殘基或殘基組的預測或實驗結果，它們可能會縮短或延長，甚至整段 CDR 都不會顯著影響抗原結合。除非另有說明，如本文所用，CDR 定義是根據 Kabat CDR 而來。

【0107】 ***效應子功能：***如本文所用，術語「效應子功能」是指可歸因於本文所述的抗原結合劑的生物活性。抗體效應子功能的實例包括：C1q 結合和補體依賴性細胞毒性；Fc 受體結合性；抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如，B 細胞受體；和 B 細胞活化)的調降。「降低或最小化」抗體效應子功能是指其較野生型或未修飾的抗體降低至少 50%(或者 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%)。抗體效應子功能的測定可由本領域一般技術人員容易地確定和測量。在一些實施例中，補體結合、補體依賴性細胞毒性和抗體依賴性細胞毒性的抗體效應子功能受到影響。在一些實施例中，效應子功能經由在恆定區中消除醣基化的突變而消除，例如「無效應子突變」。在一態樣中，該無效應子突變為 CH2 區域的 N297A 或 DANA 突變(D265A+N297A)。Shields 等人，J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604 (2001)。此外，導致效應子功能降低或消除的額外突變包括：K322A 和 L234A/L235A(LALA)。或者，效應子功能可通過生產技術而降低或消除，例如在無醣基化作用的宿主細胞(例如大腸桿菌)中表現，或其中導致醣基化模式改變成在促進效應子功能方面無效或效果較差(如 Shinkawa 等人，J. Biol. Chem. 278 (5):3466-3473 (2003))。

【0108】 ***抗體依賴性細胞介導之細胞毒性***或 ADCC 是指一種細胞毒性形式，其中分泌的 Ig 結合至某些細胞毒性細胞(例如，自然殺手(NK)細胞、中性顆粒細胞和巨噬細胞)上存在的 Fc 受體(FcR)，使這些細胞毒性效應細胞能夠特異性

地結合至攜帶抗原的標靶細胞，之後以細胞毒素殺死該標靶細胞。該抗體「武裝」該細胞毒性細胞，且為藉由這種機制殺死該標靶細胞所必需。介導 ADCC 的主要細胞為 NK 細胞，其僅表現 FcγRIII，而單核細胞則表現 FcγRI、FcγRII 和 FcγRIII。造血細胞上的 Fc 表現係摘錄於 Ravetch 和 Kinet，Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)之第 464 頁的表 3。為了評估感興趣的分子的 ADCC 活性，可進行體外 ADCC 測定法，例如美國專利號 5,500,362 或 5,821,337 中所述。用於此種測定法的可使用效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)和自然殺手(NK)細胞。替代地或額外地，可在體內評估感興趣分子的 ADCC 活性，例如在動物模型中，例如在 Clynes 等人，PNAS USA 95: 652-656 (1998)中所揭示的動物模型。

【0109】 ***抗原：***如本文所用，術語「抗原」是指引發免疫反應的試劑；及/或當暴露或投至生物體時，與 T 細胞受體(例如，當由 MHC 分子呈現時)或抗體(例如，由 B 細胞產生)結合的試劑。在一些實施例中，抗原在生物體中引發體液反應(例如，包括抗原特異性抗體的產生)；替代地或額外地，在一些實施例中，抗原在生物體中引發細胞反應(例如，涉及其受體與該抗原特異性交互作用的 T 細胞)。本領域技術人員將理解，特定抗原可在標靶生物體(例如，小鼠、兔、靈長類動物、人類)之一或數個成員中，而非在該標靶生物體物種的所有成員中，引發免疫反應。在一些實施例中，抗原在標靶生物體物種的至少約 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的成員中引發免疫反應。在一些實施例中，抗原結合至抗體及/或 T 細胞受體，且可能會或可能不會在生物體中誘發特定生理反應。在一些實施例中，例如，抗原可在體外結合至抗體及/或 T 細胞受體，無論此作用是否在體內發生。在一些實施例中，抗原與特定體液或細胞免疫的產物反應，包括由異源性免疫原誘發者。在所揭示的組成物和方法的一些實施例中，GCC 蛋白為抗原。

【0110】 ***相關聯：***作為本文使用之術語，若其中一者與另一者之存在、程度

及/或形式相關，則此二事件或者實體彼此「相關聯」。舉例而言，若特定實體(例如多肽)之存在、程度及/或形式與特定疾病、病症或者病況之發生率及/或易感性相關(例如在相關群體中)，則該特定實體視為與該特定疾病、病症或者病況相關聯。在一些實施例中，若二或者更多個實體直接或者間接相互作用，以使得其彼此物理上接近且保持物理上接近，則其彼此物理上「相關聯」。在一些實施例中，彼此物理上相關聯之二或者更多個實體彼此共價連接；在一些實施例中，彼此物理上相關聯之二或者更多個實體彼此不共價連接，但以非共價形式相關聯，例如藉助於氫鍵、凡得瓦交互作用(van der Waals interaction)、疏水相互作用、磁性及其組合。

【0111】 ***結合：***應當理解，本文所用的術語「結合」通常是指二或多個實體之間的非共價結合。「直接」結合涉及實體或部分之間的物理接觸；間接結合涉及藉由與一或多個中間實體進行物理接觸的物理交互作用。二或多個實體之間的結合可在多種情況中的任一者下進行評估- 包括相互作用的實體或部分在隔絕或在更複雜系統的情況下(例如，與載體實體及/或在生物系統或細胞中以共價或其他方式結合)。如本文所使用之「K_a」係指特定結合部分與標靶形成結合部分/標靶複合物之結合速率。如本文所使用之「K_d」係指特定結合部分/標靶複合物之解離速率。如本文所使用之「K_D」係指解離常數，其得自 K_d 比 K_a 之比率(亦即 K_d/K_a)，且以莫耳濃度(M)表示。K_D 值可使用此項技藝中良好建立之方法(例如藉由使用表面等離子體共振)或者使用生物感測器系統(例如Biacore®系統)來測定。

【0112】 ***載體：***如本文所用，術語「載體」係指與組成物一起投與之稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。在一些例示性實施例中，載體可包括無菌液體，諸如(例如)水及油，包括石油、動物、植物或合成來源之油，諸如(例如)花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及類似物。在一些實施例中，載體為或包括一或多個固體成分。

【0113】 ***特徵部分：***如本文中所用，術語「特徵部分」在最廣義而言係指稱

某一物質之一部份的存在(或不存在)與特定特徵、屬性或活性之存在(或不存在)相關聯。在一些實施例中，一物質的特徵部分是在該物質和相關物質中發現具有共享特定特徵、屬性或活性的部分，而非不共享特定特徵、屬性或活性者。

【0114】 ***密碼子最佳化：***如本文所用，「密碼子最佳化」的核酸序列是指已經改變，使得核酸序列的轉譯和所得蛋白質的表現，針對特定表現系統達增進之最佳化的核酸序列。「密碼子最佳化」的核酸序列係編碼與該「密碼子最佳化」核酸序列所基於的未最佳化親代序列相同的蛋白質。例如，一核酸序列可經「密碼子最佳化」，以在哺乳動物細胞(例如，CHO 細胞、人類細胞、小鼠細胞等)、細菌細胞(例如，大腸桿菌)、昆蟲細胞、酵母細胞或植物細胞中表現。

【0115】 ***可比較：***如本文所用，術語「可比較」是指二或多個試劑、實體、情況、條件組等，它們可能彼此不同但足夠相似，以允許在它們之間進行比較，因而可根據觀察到的差異或相似之處合理地得出結論。本領域普通技術人員將理解，在內文中，在任何特定情況下需要何種程度的一致性，才能將二或多個此類試劑、實體、情況、條件組等視為具有可比較性。

【0116】 ***對應於：***如本文所用，術語「對應於」通常用於指定有興趣多肽的胺基酸殘基的位置/一致性。普通技術人員將理解，為簡要起見，多肽中的殘基通常使用基於參考相關多肽的規範編號系統來命名，如此，「對應於」位置 190 殘基之胺基酸，舉例而言，實際上不必是特定胺基酸鏈中的第 190 個胺基酸，而是對應於該參考多肽中第 190 個殘基；本領域普通技術人員容易理解如何鑑定「相對應」的胺基酸。

【0117】 ***衍生自：***如本文所用，片語「衍生自」或「特異於指定序列」的序列是指包含大約至少 6 個核苷酸或至少 2 個胺基酸、至少約 9 個核苷酸或至少 3 個胺基酸、至少約 10-12 個核苷酸或 4 個胺基酸、或至少約 15-21 個核苷酸或 5-7 個胺基酸對應於，即，一致於或互補於例如指定序列的連續區域。在某些實施例中，該序列包含所有指定的核苷酸或胺基酸序列。如通過本領域中已知的技術確定，該序列可與特定序列獨特的序列區域互補(在聚核苷酸序列的情況下)

或一致。可衍生序列的區域包括但不限於：編碼特異性表位的區域、編碼 CDR 的區域、編碼框架序列的區域、編碼恆定域區域的區域、編碼可變域區域的區域，以及非轉譯及/或非轉錄區域。該衍生序列不一定是從研究中的感興趣序列生理性衍生而來，而可以任何方式產生，包括但不限於化學合成、複製、逆轉錄或轉錄，其基於該聚核甘酸所衍生的區域中的鹼基序列提供的信息。因此，它可以代表該原始聚核甘酸的同義或反義方向。此外，對應於指定序列的區域組合可以本領域中已知的方式進行修飾或組合，以符合預期用途。例如，一序列可包含二或多個連續序列，每一者包含指定序列的一部分，且被與指定序列不同但用於代表衍生自該指定序列的序列的區域中斷。關於抗體分子，「衍生自」包括與比較抗體在功能或結構上相關的抗體分子，例如，「衍生自」包括具有相似或實質上相同的序列或結構，例如具有相同或類似的 CDR、框架或可變區。抗體的「衍生自」亦包括殘基，例如一或多個，例如 2、3、4、5、6 個或更多個殘基，其可為連續或不連續，但根據編號流程，或與比較序列的一般抗體結構或三維鄰近性(即，在 CDR 或框架區內)的同源性，而定義出或辨識出。術語「衍生自」不限於生理性衍生，而是包括經由任何方式產生，例如藉由使用來自比較抗體的序列信息來設計另一抗體。

【0118】 ***測定：***本文所述之許多方法學包括一「測定」步驟。閱讀本說明書的本領域普通技術人員將理解，此「測定」可利用本領域技術人員可獲得的多種技術之任一者，包括例如本文明確提及的特定技術進行。在一些實施例中，測定涉及生理樣本的操作。在一些實施例中，測定涉及對數據或信息的考量及/或操作，例如利用適於執行相關分析的電腦或其他處理單元。在一些實施例中，測定涉及從來源接收相關信息及/或材料。在一些實施例中，測定涉及將樣本或實體的一或多個特徵與可比較的參考物進行比較。

【0119】 ***改造：***如本文所用，術語「經改造」描述已由人為設計或修飾及/或其存在和生產需要人為干預及/或動作的聚核甘酸、多肽或細胞。例如，旨在設計用於引發特定效果且與天然存在的相同類型細胞的效果不同的經改造細胞。

在一些實施例中，經改造細胞表現本文所述的嵌合抗原受體。在詳細說明和實例部分中描述例示性改造方法。

【0120】 ***表位：***如本文所用，術語「表位」包括被免疫球蛋白(例如，抗體或受體)結合成分全部或部分特異性辨識出的任一部分。在一些實施例中，表位由抗原中的複數個胺基酸組成。在一些實施例中，當抗原採用相關三維構型時，此類胺基酸殘基暴露於表面。在一些實施例中，當抗原採用此種構型時，胺基酸殘基在空間上彼此物理性接近或等高。在一些實施例中，當抗原採用替代構型(例如，直線化；例如，非直線形表位)時，至少一些胺基酸彼此呈物理上分隔。

【0121】 ***賦形劑：***如本文所用，術語「賦形劑」是指可包括在醫藥組成物中的非治療劑，舉例而言，以提供或有助於所需的稠度或穩定作用。合適的藥物賦形劑包括例如澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇及類似物。

【0122】 ***表現：***術語「表現」或「經表現」，當用於本文中的核酸時，是指以下事件中的一或多者：(1)DNA 模板之 RNA 轉錄物產生(例如，藉由轉錄作用)；(2)RNA 轉錄物的加工(例如，藉由剪接、編輯、5'端帽形成及/或 3'末端形成)；(3)RNA 轉譯成多肽；及/或(4)多肽的轉譯後修飾。

【0123】 ***離體：***如本文所用，術語「離體」是指在外部環境中發生的事件，例如，在多細胞生物體外部。在一些實施例中，細胞或細胞群係於多細胞生物體(例如，哺乳動物，例如非人類靈長類動物或人類)的體外進行修飾，以表現本文所述的抗 GCC 分子，在將此類細胞或細胞群投與有需要的個體之前。

【0124】 ***融合蛋白：***如本文所用，術語「融合蛋白」是指由編碼兩種不同(例如，異源性)蛋白質的至少一部分的核酸序列改造而得之核酸序列編碼的蛋白質。技術人員無疑知道，為了產生融合蛋白，係將核酸序列連接而使所得讀框不包含內部終止密碼子。在一些實施例中，如本文所述的融合蛋白包括一流

感 HA 多肽或其片段。

【0125】 ***鳥苷酸環化酶 C(GCC)：***如本文所用，「GCC」亦稱為「STAR」、「GUC2C」、「GUCY2C」或「ST 受體」蛋白是指哺乳動物 GCC，較佳為人類 GCC 蛋白。人類 GCC 是指 GenBank 登錄號：NM—004963 中描述的蛋白質及其天然存在的等位基因蛋白質變異體。其他變異體為本領域中已知的。請參見，例如，登錄號 Ensp0000261170，Ensembl Database，European Bioinformatics Institute 和 Wellcome Trust Sanger Institute，美國專利申請號 20060035852；或 GenBank 登錄號：AAB 19934。通常，天然存在的等位基因變異體具有與 SEQ ID NO: 41 至少 95%、97%或 99%一致的胺基酸序列。該轉錄物編碼具有 1073 個胺基酸的蛋白質產物，並描述於 GenBank 登錄號：NM—004963。GCC 蛋白的特徵為一種跨膜細胞表面受體蛋白，一般相信在維持腸液、電解質體內穩定和細胞增殖中扮演關鍵角色。

【0126】 ***宿主：***術語「宿主」在本文中用於指其中存在感興趣多肽的系統(例如，細胞、生物體等)。在一些實施例中，宿主為表現感興趣之特定多肽的系統。

【0127】 ***宿主細胞：***如本文所用，片語「宿主細胞」是指已引入外源性 DNA(重組性或其他)的細胞。例如，宿主細胞可用於藉由標準重組技術產生本文所述的多肽。技術人員在閱讀本揭示內容後將理解，此類術語不僅指稱特定個體細胞，並指稱此一細胞的後代。由於某些修飾可能由於突變或環境影響而在後代中發生，因此，此後代實際上可能不與親代細胞完全一致，但仍包括在本文所用術語「*宿主細胞*」的範圍內。在一些實施例中，宿主細胞包括適合於表現外源性 DNA(例如，重組性核酸序列)的任何原核和真核細胞。例示性細胞包括原核生物和真核生物(單細胞或多細胞)、細菌細胞(例如大腸桿菌、芽孢桿菌屬、鏈黴菌屬等之菌株)、分枝桿菌細胞、真菌細胞、酵母細胞(例如，釀酒酵母(S. cerevisiae)、粟酒裂殖酵母(S. pombe)、巴斯德畢赤酵母(P. pastoris)、甲醇畢赤酵母(P. methanolica)等)、植物細胞、昆蟲細胞(例如，SF-9、SF-21、經

桿狀病毒感染的昆蟲細胞、粉紋夜蛾(Trichoplusia ni)等)、非人類動物細胞、人類細胞或細胞融合體，例如雜交瘤或四重雜交瘤。在一些實施例中，該細胞為人類、猴、猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在一些實施例中，該細胞為真核細胞，並選自於以下細胞：CHO(例如，CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS(例如，COS-7)、視網膜細胞、Vero、CV1、腎(例如 HEK293、HEK293T、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60(例如 BHK21)、Jurkat、Daudi、A431 (表皮)、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、支持細胞、BRL 3A 細胞、HT1080 細胞、骨髓瘤細胞、腫瘤細胞和衍生自前述細胞之細胞株。在一些實施例中，該細胞包含一或多種病毒基因，例如表現病毒基因的視網膜細胞(例如 PER.C6™細胞)。

【0128】 ***免疫反應***：如本文所用，術語「免疫反應」是指免疫系統的細胞如 B 細胞、T 細胞、樹突細胞、巨噬細胞或多形核細胞，對於刺激如抗原或疫苗之反應。免疫反應可包括參與宿主防禦反應的任何身體細胞，包括例如分泌干擾素或細胞因子的上皮細胞。免疫反應包括但不限於先天性及/或適應性免疫反應。如本文所用，保護性免疫反應是指保護個體不受感染(預防感染或防止與感染相關的疾病的發展)的免疫反應。測量免疫反應的方法為本領域中眾所周知的，包括例如測量淋巴細胞(例如 B 或 T 細胞)的增殖及/或活性、細胞因子或趨化因子的分泌、發炎、抗體產生、及類似反應。

【0129】 ***體外***：如本文所用，術語「體外」是指在人為環境中發生的事件，例如在試管或反應容器中、在細胞培養物中等，而非在多細胞生物體內。

【0130】 ***體內***：如本文所使用之術語「*活體內*」係指事件發生在諸如人類與非人類動物之多細胞生物體內。在細胞-基礎系統的內文中，該術語可用於指稱在活細胞內發生的事件(與例如體外或離體系統相反)。

【0131】 ***經分離：***如本文所用，術語「經分離的」是指物質及/或實體(1)與最初生產時(無論是在自然界及/或在實驗環境中)相結合的至少一些成分分離，

及/或(2)在人為干預下設計、生產、製備及/或製造。經分離的物質及/或實體可與其最初結合的其他成分之約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%或超過約 99%分離。在一些實施例中，經分離的試劑的純度為約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%，或超過約 99%。如本文所用，如果該物質實質上不含其他成分，則該物質為「純的」。在一些實施例中，如本領域技術人員將理解的，該物質在與某些其他成分例如一或多種載體或賦形劑(例如，緩衝液、溶劑、水等)組合之後，仍可視為「經分離的」或甚至「純的」；在此類實施例中，計算該物質的經分離百分比或純度時不包括此類載體或賦形劑。僅作為一實例，在一些實施例中，在以下情況下，自然界中存在的諸如多肽或聚核甘酸的生物性聚合物被認為是「經分離的」，當：a)由於其起源或衍生來源不與某些或所有在自然狀態下伴隨它的成分結合；b)它實質上不含來自於自然界產生它的物種之相同物種的其他多肽或核酸；c)由非來自於自然界產生它的物種之細胞或其他系統表現，或與該細胞中的成分結合。因此，例如，在一些實施例中，化學合成的或在不同於天然產生它的細胞系統中合成的多肽被認為是「經分離的」多肽。替代地或額外地，在一些實施例中，已進行一或多種純化技術的多肽可被認為是「經分離的」多肽，因為它已與以下的其他成分分離：a)在天然狀態下與其結合者；及/或 b)最初生產時與之結合者。在一些實施例中，細胞可與其他細胞「分離」(例如，純化或分離)。例如，在一些實施例中，可從未修飾的細胞中分離出經改造以表現本文所述的 CAR 之經基因修飾細胞。

【0132】 ***核酸***：如本文所用，片語「核酸」，就最廣義而言，係指其為寡核苷酸鏈或可加入寡核苷酸鏈中的任何化合物及/或物質。在一些實施例中，核酸為寡核苷酸鏈或可經由磷酸二酯連結加入寡核苷酸鏈中的化合物及/或物質。從內文可清楚地看出，在一些實施例中，「核酸」是指各核酸殘基(例如，核苷酸

及/或核苷)；在一些實施例中，「核酸」是指包含各核酸殘基的寡核苷酸鏈。在一些實施例中，「核酸」為或包含 RNA；在一些實施例中，「核酸」為或包含 DNA。在一些實施例中，核酸為、包含或由一或多個天然核酸殘基組成。在一些實施例中，核酸為、包含或由一或多種核酸類似物組成。在一些實施例中，核酸類似物與核酸的不同之處在於它不利用磷酸二酯骨架。例如，在一些實施例中，核酸為、包含或由一或多種本領域中已知在主鏈中具有肽鍵而非磷酸二酯鍵的「肽核酸」組成，視為落入本發明範疇中。替代地或額外地，在一些實施例中，核酸具有一或多個硫代磷酸酯及/或 5'-N-亞磷醯胺連結而非磷酸二酯鍵。在一些實施例中，核酸為、包含或由一或多種天然核苷(例如，腺苷、胸苷、鳥苷、胞苷、尿苷、去氧腺苷、去氧胸苷、去氧鳥苷和去氧胞苷)組成。在一些實施例中，核酸為、包含或由一或多種核苷類似物(例如，2-胺基腺苷、2-硫胸苷、肌苷、吡咯併-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5 丙炔基-胞苷、C-5 丙炔基-尿苷、2-胺基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-胺基腺苷、7-去氮腺苷、7-去氮鳥苷、8-氧代腺苷、8-氧代鳥苷、O(6)-甲基鳥嘌呤、2-硫胞苷、甲基化鹼基、嵌入鹼基及其組合)。在一些實施例中，與天然核酸相較，核酸包含一或多種經修飾的醣類(例如，2'-氟核醣、核醣、2'-去氧核醣、阿拉伯醣和己醣)。在一些實施例中，核酸具有編碼功能基因產物例如 RNA 或蛋白質的核苷酸序列。在一些實施例中，核酸包括一或多個內含子。在一些實施例中，核酸由自天然來源分離、以互補模板為基礎進行聚合之酵素合成(體內或體外)、在重組細胞或系統中繁殖、及化學合成之一或多者製備。在一些實施例中，核酸為至少 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、20、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000 或更多殘基長度。在一些實施例中，核酸為單股；在一些實施例中，核酸為雙股。在

一些實施例中，核酸具有一核苷酸序列，其包含至少一編碼一多肽的元件，或為編碼一多肽之序列的互補物。在一些實施例中，核酸具有酵素活性。

【0133】 ***醫藥學上可接受的載體***：可用於本揭示的醫藥學上可接受的載體(媒劑)為常規性的。Remington's Pharmaceutical Sciences，E. W. Martin, Mack 出版公司發行，Easton, PA, 第 15 版(1975)中，描述適用於一或多種治療組成物的藥物遞送的組成物和配方(例如，包含本文所述的嵌合性抗原受體的組成物)，以及額外醫藥試劑。一般而言，載體的性質將取決於所採用的特定投藥模式。例如，腸胃外配方通常包含可注射流體，其包括醫藥學上和生理學上可接受的流體，例如水、生理食鹽水、平衡鹽類溶液、右旋糖水溶液、甘油或類似物作為媒劑。對於固體組成物而言(例如，粉末、藥片、錠劑或膠囊形式)，傳統的無毒固體載體可包括例如醫藥級的甘露醇、乳糖、澱粉或硬脂酸鎂。除了生物中性載體之外，待投與的醫藥組成物可包含少量無毒性輔助物質，例如潤濕劑或乳化劑、防腐劑和 pH 緩衝劑及類似物，例如乙酸鈉或單月桂酸脫水山梨醣酯。

【0134】 ***多肽***：「多肽」，一般而言，為藉由一肽鍵彼此連接的至少兩個胺基酸的串聯。在一些實施例中，多肽可包括至少 3 至 5 個胺基酸，每一胺基酸藉由至少一個肽鍵連接到其他胺基酸。本領域普通技術人員將理解，多肽有時包括「非天然」胺基酸或其他實體，儘管如此，它們仍能夠視情況整合到多肽鏈中。在一些實施例中，術語「多肽」用於指多肽的特定功能類別，例如抗體、嵌合性抗原受體或共刺激域多肽等。對於每一此種類別，本說明書提供及/或本領域已知該類別內已知例示性多肽的胺基酸序列的數個實例；在一些實施例中，一或多種此類已知多肽為該類別的參考多肽。在此類實施例中，術語「多肽」是指顯示出與相關參考多肽足夠的序列同源性或一致性的類別的任一成員，本領域技術人員將理解該參考多肽應包括在該類別中。在許多實施例中，代表性類別之成員亦與該參考多肽共享顯著的活性。例如，在一些實施例中，一成員多肽顯示出與參考多肽至少約 30-40%的整體序列同源性或一致性，且通常大於

約 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多，及/或包括至少一區域(即保守區域，通常包括特徵序序列元素)顯示出非常高的序列一致性，通常大於 90%，甚至 95%、96%、97%、98%或 99%。此類保守區通常包含至少 3-4 個，且經常多達 20 個或更多個胺基酸；在一些實施例中，保守區包含至少一段至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或更多個連續胺基酸。

【0135】 應理解，本發明的抗體和抗原結合劑可具有額外的保守或非必需胺基酸取代，其對多肽功能沒有實質性影響。該特定取代是否可被容忍，即不會不利地影響所需的生物學特性(例如結合活性)，可如 Bowie, J U 等人，Science 247：1306-1310 (1990)或 Padlan 等人，FASEB J. 9：133-139 (1995)中所述決定。「保守性胺基酸取代」是其中胺基酸殘基被具有類似側鏈的胺基酸殘基置換的取代。具有類似側鏈的胺基酸殘基家族已在本領域中定義出。這些家族包括具有鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天門冬胺酸、麩胺酸)、不帶電荷的極性側鏈(例如天冬醯胺、麩胺醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、異亮胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、β-支鏈側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異亮胺酸)和芳香側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)的胺基酸。

【0136】 ***預防:*** 如本文所用，術語「預防」是指預防、避免疾病表現、延遲發作及/或降低特定疾病、病症或病況(例如，感染如流感病毒)的一或多種症狀的頻率及/或嚴重性。在一些實施例中，預防係以群體為基礎評估，若在對該疾病、病症或病況易感的人群中觀察到該疾病、病症或病症的一或多種症狀的發展、頻率及/或強度在統計學上顯著降低，則認為該試劑「預防」該特定疾病、病症或病況。

【0137】 ***純的：*** 如本文所用，如果試劑或實體實質上不含其他成分，則其為「純的」。例如，包含超過約 90%的特定試劑或實體的製劑通常被認為是純製劑。在一些實施例中，試劑或實體為至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少

94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少為 99%的純度。

【0138】 ***重組***：如本文所用，術語「重組」係指藉由重組方式設計、改造、製備、表現、創造或分離出的多肽(例如，如本文所述的多肽)，例如使用重組表現載體轉染宿主細胞而表現之多肽、由重組、組合式多肽庫中分離出的多肽、或藉由涉及將選定序列元件剪接成另一者之任何其他方式製備、表現、創造或分離出的多肽。在一些實施例中，一或多種此類的選定序列元件是在自然界中發現的。在一些實施例中，一或多種此類的選定序列元件及/或其組合是經電腦設計。在一些實施例中，一或多種此類的選定序列元件由多個(例如，二或多個)已知序列元件的組合產生，這些已知序列元件並非天然存在於同一多肽中(例如，來自兩個單獨 HA 多肽的兩個表位)。

【0139】 ***參考物***：術語「參考物」在本文中經常用於描述標準或對照試劑、個體、群體、樣本、序列或數值，與感興趣的試劑、個體、群體、樣本、序列或數值進行比較。在一些實施例中，參考試劑、個體、群體、樣本、序列或數值之測試或測定，實質上同時與感興趣的試劑、個體、群體、樣本、序列或數值進行測試及/或測定。在一些實施例中，參考試劑、個體、群體、樣本、序列或數值是經驗參考物，視情況在有形媒介中具體化。通常，如本領域技術人員將理解的，參考試劑、個體、群體、樣本、序列或數值，係用於在可比較的條件下測定或鑑定有興趣的試劑、個體、群體、樣本、序列或數值。

【0140】 ***單域抗體***：如本文所用，術語「單域抗體(sdAb)」、「可變單域」或「免疫球蛋白單可變域(ISV)」、「單重鏈可變域(VH)抗體」是指與標靶抗原結合之抗體之單一可變片段。這些術語在本文中可互換使用。sdAb 為具有三個互補決定區(CDR)的單一抗原結合多肽。僅具 sdAb 便能夠結合抗原，而不須與相對應的含 CDR 多肽成對。VH 單域抗體是指具有一人類重鏈可變域或一衍生自人類重鏈可變域的結構域之單域抗體。在一些情況下，單域抗體由駱駝源化 HCAbs 改造而成，而其重鏈可變域被稱為「VHH」。某些 VHH 亦可稱為奈米抗體。駱駝源化 sdAb 是最小的已知抗原結合抗體片段之一(請參見，例如

Hamers-Casterman 等人，Nature 363: 446-8 (1993)；Greenberg 等人，Nature 374: 168-73 (1995)；Hassanzadeh-Ghassabeh 等人，Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013))。基本 VHH 從 N 端到 C 端具有以下結構：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，其中 FR1 至 FR4 係分別指框架區 1 至 4，其中 CDR1 至 CDR3 係指互補決定區 1 至 3。如下文所解釋，本發明各態樣的一些實施例相關於一種結合試劑，其包含單一重鏈可變域抗體/免疫球蛋白重鏈單一可變域，其可在輕鏈不存在的情況下，與 GCC 抗原結合。

【0141】 ***個體***：如本文所用，術語「個體」是指任何哺乳動物，包括人類。在本發明的某些實施例中，個體為成人、青少年或嬰兒。在一些實施例中，術語「個人」或「患者」被使用且可與「個體」互換。本發明亦涵蓋醫藥組成物的投與及/或子宮內治療方法的進行。例如，個體可為患有癌症(例如胃腸來源)、癌症症狀的患者(例如人類患者或動物患者)，其中至少一些細胞表現 GCC，或有癌症傾向的患者，其中至少一些細胞表現 GCC。本發明的術語「非人類動物」包括所有非人類脊椎動物，例如非人類哺乳動物和非哺乳動物，例如非人類靈長類動物、綿羊、狗、牛、雞、兩棲動物、爬行動物等，除非另有說明。

【0142】 ***實質上***：如本文所用，術語「實質上」是指具有感興趣的特徵或特性的全部或接近全部範圍或程度的定性條件。生物學領域的普通技術人員將理解，生物和化學現象很少(若有的話)完成及/或繼續完成或達到或避免一絕對的結果。因此，術語「實質上」在本文中用於包羅許多生物及化學現象中固有之潛在缺乏的完全性。

【0143】 ***治療劑：***如本文所用，術語「治療試劑」是指具有生物活性的試劑(例如，抗原結合劑)。該術語在本文中用於指稱化合物、化合物的混合物、生物大分子或由生物材料製成的萃取物。在一些實施例中，該治療劑可為抗癌劑或化學治療劑。如本文所用，術語「抗癌劑」或「化療劑」是指具有抑制人類腫瘤，特別是惡性(癌性)病變，例如癌、肉瘤、淋巴瘤或白血病的發展或進展的功能特性的試劑。抑制轉移或血管生成通常是抗癌劑或化學治療劑的特性。

化學治療劑可為細胞毒性劑或細胞抑制劑。術語「細胞抑制劑」是指抑制或壓抑細胞生長及/或細胞增殖的試劑。在一些實施例中，該治療劑為經基因修飾的細胞或抗體。在一些實施例中，該治療劑為抗GCC CAR。在一些實施例中，該治療劑為表現本文所述的 GCC CAR 的細胞(例如，細胞群)。

【0144】 ***轉型***：如本文所用，係指將外源性 DNA 引入宿主細胞的任一過程。可使用本領域中眾所周知的各種方法在自然或人工條件下進行轉型。轉型可依賴於將外源核酸序列插入原核或真核宿主細胞中的任何已知方法。在一些實施例中，係基於被轉型的宿主細胞而選擇特定的轉型方法學，且可包括但不限於：病毒感染、電穿孔、交配、轉染、脂質轉染。在一些實施例中，「*經轉型的*」細胞被穩定轉型，因為插入的DNA能夠作為自主複製質體或作為宿主染色體的一部分而進行複製。在一些實施例中，經轉型的細胞在有限的時間段內暫時表現引入的核酸。

【0145】 ***治療或治療***：如本文所用，術語「治療(treat)」或「治療(treatment)」係定義為將抗 GCC 抗原結合劑((如抗 GCC 抗體或其片段、抗 GCC CAR、包含抗 GCC CAR 之細胞等)投至一個體，例如患者，或投至(例如藉由施加)從個體分離出的組織或細胞中，之後送回該個體中。該抗 GCC 抗原結合劑可單獨投藥或與第二試劑組合投藥。治療可為治癒、療癒、緩解、減輕、改變、補救、改善、緩和、增進或影響該病症、該病症的症狀或該病症的傾向，例如癌症。儘管不希望受理論束縛，但一般相信治療可在體外或體內引起細胞的抑制、消融或殺傷，或以其他方式降低細胞(例如異常細胞)介導疾病，如本文所述的病症(例如，癌症)的能力。

【0146】 ***可變區或域***：：如本文所用，術語抗體的「可變區」或「可變域」是指抗體重鏈或輕鏈的胺基端域。重鏈和輕鏈的可變域可分別稱為「VH」和「VL」。這些域通常是抗體中變化最大的部分(相對於同一類別的其他抗體)並包含抗原結合位點。僅具重鏈的抗體具有單一重鏈可變區。

【0147】 ***載體***：如本文所用，術語「載體」是指能夠傳送與其連接的另一核

酸的核酸分子。其中一種載體類型為「質體」，其係指環狀雙股DNA環，其中可接合額外的 DNA 片段。另一種載體類型為病毒載體，其中額外的 DNA 片段可接合至該病毒基因組中。某些載體能夠在它們被引入的宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌複製起點的細菌載體和附加型哺乳動物載體)。其他載體(例如，非附加型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞後整合至宿主細胞的基因組中，因而與宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠主導與其操作性連接的基因之表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。

特定實施例之詳細描述

【0148】　本發明係基於發現特異性結合至鳥苷酸環化酶 C (GCC)之新穎抗原結合劑及其在治療方法中之用途。本發明提供抗 GCC 單域抗體(sdAb)及嵌合抗原受體(CAR)，其包含一細胞外抗原結合域，該細胞外抗原結合域包含一或多個 GCC 結合部分(如抗 GCC sdAbs)。

【0149】　本發明不限於本文所述之特定方法或實驗條件，因為此方法或實驗條件可變化。亦應理解，本文中所用之術語僅用於描述特定實施例之目的，且非用於限制，除非指明，因為本發明之範疇將僅受所附申請專利範圍限制。

鳥苷酸環化酶 C

【0150】　鳥苷酸環化酶 C(GCC)(亦稱為 STAR、ST 受體、GUC2C 和 GUCY2C)為一種跨膜細胞表面受體，其在維持腸液、電解質穩態和細胞增殖中發揮作用(Carrithers 等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3018-3020 (2003)；Mann 等人，*Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-466 (1997)；Pitari 等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2695-2699 (2003))；GenBank 登錄號 NM_004963，其每一者係以引用之方式併入本文中)。此功能是經由鳥苷酸的結合而介導(Wiegand 等人，FEBS Lett. 311:150-154 (1992))。GCC 亦為熱穩定腸毒素(ST，例如，具有 NTFYCCELCCNPACAGCY、SEQ ID NO: 40 的胺基酸序列)的受體，它是由大腸桿菌以及其他感染性生物體產生的胜肽(Rao, M. C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-

93 (1985); Knoop F. C.及 Owens、M. J. *Pharmacol. Toxicol. Methods* 28:67-72 (1992))。ST與GCC的結合活化導致腸道疾病(例如腹瀉)的信號級聯反應。人類GCC 的核苷酸序列(GenBank 登錄號 NM—004963)。人類 GCC 之胺基酸序列(GenPept 登錄號 NP—004954)：

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAF
AEPLKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGD
CRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMIS
AGSFGLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTS
YVYKNGTETEDCFWYLNALEASVSYFSHELGFKVVLRQDKEFQDILM
DHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLKGDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFEDNVT
APDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLFGH
MLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLL
YTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKLPNDITGRGP
QILMIAVFTLTGAVVLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKWSHIPPENIFP
LETNETNHVSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKRVILKDLKHNDGNFT
EKQKIELNKLLQIDYYNLTKFYGTVKLDTMIFGVIEYCERGSLREVLND
TISYPDGTFMDWEFKISVLYDIAKGMSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVD
SRMVVKITDFGCNSILPPKKDLWTAPEHLRQANISQKGDVYSYGIIAQE
IILRKETFYTLSCRDRNEKIFRVENSNGMKPFRPDLFLETAEEKELEVYL
LVKNCWEEDPEKRPDFKKIETTLAKIFGLFHDQKNESYMDTLIRRLQLY
SRNLEHLVEERTQLYKAERDRADRLNFMLLPRLVVKSLKEKGFVEPEL
YEEVTIYFSDIVGFTTICKYSTPMEVVDMLNDIYKSFDHIVDHHDVYKV
ETIGDAYMVASGLPKRNGNRHAIDIAKMALEILSFMGTFELEHLPGLPI
WIRIGVHSGPCAAGVVGIKMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPLRIHVS
GSTIAILKRTECQFLYEVRGETYLKGRGNETTYWLTGMKDQKFNLPTP
PTVENQQRLQAEFSDMIANSLQKRQAAGIRSQKPRRVASYKKGTLEYL
QLNTTDKESTYF (SEQ ID NO: 41)

【0151】 GCC 蛋白具有一些一般可接受的結構域，每個域都有助於 GCC 分子的功能。GCC 的功能包括將蛋白質引導至細胞表面的信號、細胞外配體之結

合、酪胺酸激酶活性和鳥苷酸環化酶催化活性。在正常人體組織中，GCC 係於黏膜細胞中表現，例如在小腸、大腸和直腸內襯的頂端刷狀緣膜(Carrithers 等人，*Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996))。GCC 的表現在腸上皮細胞發生腫瘤轉型後仍維持，其在所有原發性和轉移性大腸直腸腫瘤中表現(Carrithers 等人，*Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc 等人，Eur J *Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers 等人，*Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994))。來自胃、食道和胃食道交界處的腫瘤細胞亦表現 GCC(請參見例如美國專利號 6,767,704；Debruyne 等人，*Gastroenterology* 130:1191-1206 (2006))。組織特異性表現以及與癌症(例如胃腸來源的癌症(例如大腸癌、胃癌或食道癌))的關聯，可用於開發使用 GCC 作為該疾病的診斷標誌物(Carrithers 等人，*Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc 等人，*Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005))。

【0152】 作為細胞表面蛋白，GCC 亦可作為受體結合蛋白例如抗體或配體的治療標靶。在正常腸組織中，GCC 在上皮細胞緊密連接的頂端表現，該緊密連接在腔內環境和血管隔室之間形成不可滲透的屏障(Almenoff 等人，*Mol Microbiol* 8: 865-873); Guarino 等人，*Dig Dis Sci* 32: 1017-1026 (1987))。因此，全身靜脈內投與 GCC 結合蛋白治療劑對腸道 GCC 受體的影響最小，同時可接觸胃腸系統的腫瘤細胞，包括侵襲性或轉移性大腸癌細胞、腸外或轉移性大腸腫瘤、食道腫瘤或胃腫瘤、胃食道交界處的腺癌。此外，GCC 會由於配體結合而經由受體介導的內吞作用而內化(Buc 等人，*Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Urbanski 等人，*Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995))。

【0153】 針對 GCC 的細胞外域產生的多株抗體(Nandi 等人，*Protein Expr. Purif.* 8:151-159 (1996))能夠抑制 ST 胜肽結合至人類和大鼠 GCC，且抑制人類 GCC 造成的 ST-介導 cGMP 產生。

【0154】 GCC 已被鑑定為一種涉及癌症(包括大腸癌)的蛋白質。亦請參見 Carrithers 等人，*Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc 等人，*Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers 等人，*Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994);

Urbanski 等人，*Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995)。

【0155】 本文描述的針對 GCC 的抗原結合分子治療劑可用於抑制表現 GCC 的癌細胞。本發明的抗 GCC 抗原結合分子可結合至人類 GCC。在一些實施例中，本發明的抗 GCC 抗原結合分子可抑制配體(例如鳥苷酸或熱穩定腸毒素)與 GCC 的結合。

抗原結合分子

【0156】 本發明涉及抗 GCC 抗原結合分子。在一些實施例中，本發明的抗 GCC 分子在其結合之表現 GCC 的細胞上與 GCC 結合後引起細胞反應。在一些實施例中，本發明的抗 GCC 抗原結合劑可阻斷配體結合至 GCC。

【0157】 天然發生的哺乳動物抗體的典型結構單元為四聚體。每個四聚體由兩對多肽鏈組成，每對具有一條「輕」鏈(約 25 kDa)和一條「重」鏈(約 50-70 kDa)。每條鏈的胺基端部分包括主要負責抗原識別的約 100 至 110 個或更多個胺基酸的可變區。每條鏈的羧基端部分定義出主要負責效應子功能的恆定區。人類輕鏈可分為 κ 和 λ 輕鏈。重鏈可分為 μ、δ、γ、α 或 ε，並將抗體的同種型分別定義為 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在輕鏈和重鏈內，可變區和恆定區由一具約 12 個或更多胺基酸的「J」區連接，其中重鏈亦包括一具約 10 個以上的胺基酸的「D」區。一般請參見 *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W.編，二編，Raven Press, N.Y. (1989))。每一輕/重鏈對的可變區形成抗體結合位點。抗 GCC 抗體分子的較佳同種型為 IgG 免疫球蛋白，其可分為四種亞型，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4，各具有不同的 γ 重鏈。大多數治療性抗體為 IgG1 類型的人類、嵌合性或人源化抗體。在一特定實施例中，該抗 GCC 抗體分子具有 IgG1 同種型。

【0158】 每一重鏈和輕鏈對的可變區形成抗原結合位點。因此，完整的 IgG 抗體具有兩個相同的結合位點。然而，雙功能或雙特異性抗體為人工雜交構建體，其具有兩個不同的重/輕鏈對，導致兩個不同的結合位點。

【0159】 這些鏈都具有由三個高度變異區(亦稱為互補決定區或 CDR)連接的

相對保守框架區(FR)的相同一般結構。來自每對兩條鏈的 CDR 藉由框架區對齊，而能夠與特異性表位結合。從N端到C端，輕鏈和重鏈均包含域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。每一結構域的胺基酸係依據下列文獻之定義指定：Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 及 1991))或 Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia 等人，*Nature* 342:878-883 (1989)。如本文所用，CDR 係依據 Kabat 針對重鏈(HCDR1、HCDR2、HCDR3)和輕鏈(LCDR1、LCDR2、LCDR3)之每一者之規則而指稱。

【0160】 抗 GCC 抗體分子可包含本文所述抗體的全部、或 CDR 或重鏈的抗原結合子集。本文描述的抗 GCC 抗原結合劑的胺基酸序列，包括可變區和 CDR，可見於表 1 至 3。

【0161】 因此，在一實施例中，該抗體分子包括以下之一或二者：

【0162】 (a)一、二、三個或抗原結合數目之人類抗體之輕鏈 CDR (LCDR1、LCDR2 及/或 LCDR3)，例如衍生自人類雜交瘤的抗體或鼠類抗體者(例如，US20180355062A1 中描述的 GCC 抗體的輕鏈，其以全文引用之方式併入本文中)。在實施例中，該 CDR 可包含如下的 LCDR1 至 3 之一或多個或全部的胺基酸序列：LCDR1 或經修飾的 LCDR1，其中一到七個胺基酸經保守性取代；LCDR2 或經修飾的 LCDR2，其中一或兩個胺基酸經保守性取代；或 LCDR3 或經修飾的 LCDR3，其中一或兩個胺基酸經保守性取代；以及

【0163】 (b)一、二、三個或抗原結合數目之重鏈 CDR (HCDR1、HCDR2 及/或 HCDR3)，如本文所述。在實施例中，CDR 可包含如下的 HCDR1 至 3 中的一或多個或全部的胺基酸序列：HCDR1 或經修飾的 HCDR1，其中一或兩個胺基酸經保守性取代；HCDR2 或經修飾的 HCDR2，其中一至四個胺基酸經保守性取代；或 HCDR3 或經修飾的 HCDR3，其中一或兩個胺基酸經保守性取代。

【0164】 在一些實施例中，本發明的抗 GCC 抗體分子可使表現 GCC 的細胞(例如腫瘤細胞)產生抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。由於其具有結合至 Fc 受體的

能力，具有 IgG1 和 IgG3 同種型的抗體可用於引發抗體依賴性細胞毒性能力之效應子功能。具有 IgG2 和 IgG4 同種型的抗體可用於使 ADCC 反應最小化，因為它們結合至 Fc 受體的能力低。在相關實施例中，可進行抗體的 Fc 區取代或醣基化組成的變化，例如藉由在經修飾的真核細胞株中生長，以增強 Fc 受體辨識、結合及/或介導抗 GCC 抗體所結合之細胞的細胞毒性(請參見，例如，美國專利號 7,317,091、5,624,821、和文獻包括 WO 00/42072、Shields 等人，*J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001)、Lazar 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:4005-4010 (2006)，Satoh 等人，*Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006))。在某些實施例中，抗體或抗原結合片段(例如，人源化抗體、人類抗體)可包括改變或裁剪功能(例如，效應子功能)的胺基酸取代或置換。例如，人類來源恆定區(例如，γ1 恆定區、γ2 恆定區)可設計為降低補體活化及/或 Fc 受體結合。(請參見，例如，美國專利第 5,648,260 號(Winter 等人)、美國專利第 5,624,821 號(Winter 等人)和美國專利第 5,834,597 號(Tso 等人)，其全部教示係以全文引用之方式併入本文中)。較佳地，包含此類胺基酸取代或置換的人類來源恆定區胺基酸序列，與人類來源之未經改變恆定區胺基酸序列在全長上至少約 95%一致，更佳地，與人類來源之未經改變恆定區胺基酸序列在全長上至少約 99%一致。額外的抗 GCC 抗原結合分子進一步描述於美國專利號 8,785,600 (Nam 等人)，其全部教示係以引用之方式併入本文中。

【0165】 在又一實施例中，效應子功能亦可藉由調節抗體的醣基化模式來改變。改變是指刪除抗體中發現的一或多個醣類部分，及/或加入一或多個抗體中不存在的醣基化位點。例如，在美國專利申請公開號 2003/0157108 (Presta)中描述具有增強的 ADCC 活性和成熟的醣類結構的抗體，該結構缺乏連接到抗體 Fc 區的岩藻醣。亦請參見美國專利申請公開號 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo 股份有限公司)。Glycofi 亦開發出能夠產生抗體特異性醣型的酵母細胞株。

【0166】 額外地或替代地，可製備具有醣基類型改變的抗體，例如具有降低量的岩藻醣基殘基的低岩藻醣基化抗體、或具有增加的等分 GlcNac 結構的抗體。

此種改變的醣基化模式已被證明可增加抗體的 ADCC 能力。此類醣類修飾可藉由例如在具有經改變的醣基化機制的宿主細胞中表現該抗體而達成。本領域已描述具有改變的醣基化機制的細胞，且可使用作為宿主細胞，其中經改造以表現本發明的重組抗體，因而產生具有改變的醣基化的抗體。例如，EP 1,176,195 (Hang 等人)中描述具有功能被破壞的 FUT8 基因的細胞株，該基因編碼岩藻醣基轉移酶，使得在此類細胞株中表現的抗體展現低岩藻醣基化。PCT 公開號 WO 03/035835 (Presta)描述一種變異性 CHO 細胞株--Lec13 細胞，其將岩藻醣連接至 Asn(297)-連接醣類上的能力降低，亦導致在該宿主細胞中表現的抗體呈現低岩藻醣基化(亦請見 Shields, R. L.等人，2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740)。PCT 公開號 WO 99/54342 (Umana 等人)描述經改造以表現醣蛋白修飾醣基轉移酶(例如，β(1,4)-N 乙醯胺基葡萄醣基轉移酶 III (GnTIII))的細胞株，使得在該經改造細胞株中表現的抗體表現出增加的等分 GlcNac 結構，這導致抗體的 ADCC 活性增加(亦請參見 Umana 等人，1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180)。

【0167】　人源化抗體亦可使用 CDR-嫁接方法製備。產生此類人源化抗體的技術為本領域中已知的。通常，人源化抗體是藉由獲得編碼與 GCC 結合的抗體之可變重鏈和可變輕鏈序列的核酸序列、辨識該可變重鏈和可變輕鏈序列中的互補決定區或「CDR」，並將該 CDR 核酸嫁接至人類框架核酸序列上而產生。(請參見，例如，美國專利號 4,816,567 和 5,225,539)。CDR 和框架殘基的位置可確定(請參見 Kabat, E. A.等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，美國衛生及公共服務部，NIH 出版編號 91-3242，以及 Chothia, C.等人，*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。

【0168】　本文所述的抗 GCC 抗體分子具有表 5 和 6 列出的 CDR 胺基酸序列和編碼各 CDR 的核酸序列。在一些實施例中，可將表 5 和 6 的序列加入可識別 GCC 的分子中，以用於本文描述的治療或診斷方法中。選出的人類框架為一種適合體內投藥的框架，這意味著它不具有免疫原性。例如，此種決定可經由此類抗體的體內使用和胺基酸相似性研究的先前經驗而進行。合適的框架區可選

自於人類來源抗體，其在與供體抗體如抗 GCC 抗體分子(例如 3G1)的等效部分(例如框架區)的胺基酸序列內的框架區長度上，具有至少約 65%胺基酸序列一致性，較佳至少約 70%、80%、90%或 95%胺基酸序列一致性。可使用合適的胺基酸序列比對演算法，例如 CLUSTAL W，使用預設參數來決定胺基酸序列一致性。(Thompson J. D.等人，*Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994))。

【0169】 一旦辨識出待人源化的複製抗體之 CDR 和 FR，便可辨識出編碼該 CDR 的胺基酸序列，並將相對應的核酸序列嫁接到選定的人類 FR 上。此可使用已知的引子和連接子來完成，其選擇為本領域中已知的。特定人類抗體的所有 CDR 可被非人類 CDR 的至少一部分替換，或者僅部分 CDR 可被非人類 CDR 替換。僅需要替換該人源化抗體與預定抗原結合所需的 CDR 數量。在 CDR 嫁接至選定的人類 FR 上後，所得的「人源化」可變重鏈和可變輕鏈序列係經表現，以產生與 GCC 結合的人源化 Fv 或人源化抗體。較佳地，經 CDR-嫁接的(例如，人源化的)抗體係以與供體抗體的親和力相似、實質上相同或更好的親和力與 GCC 蛋白結合。通常，該人源化可變重鏈和輕鏈序列係表現為具有人類恆定域序列的融合蛋白，因此獲得與 GCC 結合的完整抗體。然而，可產生不包含該恆定序列的人源化 Fv 抗體。

【0170】 人源化抗體，其中特定胺基酸已經取代、刪去或加入，亦落於本發明範圍內。特別地，人源化抗體可在框架區具有胺基酸取代，例如以增進與抗原的結合。例如，經選定、小數目的人源化免疫球蛋白鏈的接受者框架殘基，可被相對應的供體胺基酸置換。取代的位置包括與 CDR 相鄰的胺基酸殘基，或能夠與 CDR 相互作用的胺基酸殘基(請參見例如美國專利號 5,585,089 或 5,859,205)。接受者框架可為成熟的人類抗體框架序列或共通序列。如本文所用，術語「共通序列」是指在相關家族成員中的某一區域之序列的每一位置處最常見的或由最共通的殘基設計的序列。有多種人類抗體共通序列可使用，包括人類可變區不同亞群的共通序列(請參見 Kabat, E. A.,等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，美國衛生及公共服務部，美國政府印務局

(1991))。Kabat 數據庫及其應用可在線上免費獲得，例如經由 IgBLAST，國家生物技術信息中心，貝塞斯達，馬里蘭州(亦請見，Johnson, G.及 Wu, T. T., *Nucleic Acids Research* 29:205-206 (2001))。

【0171】 在某些實施例中，該 GCC 抗體分子為人類抗 GCC IgG1 抗體。由於此類抗體具有與 GCC 分子所希望的結合，因此此類抗體中的任一者皆可容易地進行同種型轉換，以產生人類 IgG4 同種型，例如，同時仍具有相同的可變區(其定義該抗體的特異性和親和力，在一定程度上)。因此，當產生滿足如上文所討論的希望「結構」屬性的抗體候選物時，它們通常可提供至少某些經由同種型轉換所希望的額外「功能」屬性。

【0172】 在一些態樣中，包含一抗體片段的本發明 CAR 組成物的一部分係經人源化，其中保留對標靶抗原的高親和力和其他有利的生物學特性。根據本發明之一態樣，人源化抗體和抗體片段是藉由使用親本和人源化序列的三維模型分析該親本序列和各種概念性人源化產物的方法而製備。三維免疫球蛋白模型為一般可獲得，且為本領域技術人員所熟悉的。可使用電腦程式來演示和展示選定的候選免疫球蛋白序列的可能三維構形結構。檢查這些展示允許分析該殘基在候選免疫球蛋白序列的功能中可能扮演的角色，例如影響候選免疫球蛋白結合至標靶抗原的能力的殘基分析。

【0173】 以此方式，可從接受和導入序列中選擇和組合 FR 殘基，以獲得期望的抗體或抗體片段特徵，例如對標靶抗原的親和力增加。一般而言，CDR 殘基直接且最實質地涉及影響抗原結合。

【0174】 人源化抗體或抗體片段可保留與原始抗體相似的抗原特異性，例如，在本發明中，與人類 GCC 結合的能力。在一些實施例中，人源化抗體或抗體片段可具有增進的與人類 GCC 結合的親和力及/或特異性。

【0175】 在一些實施例中，該抗 GCC 抗原結合劑包含表 1 中提供的一或多個 CDR 序列。在一些實施例中，該抗 GCC 抗原結合劑包含具有表 1 中提供的 CDR1 的重鏈可變區。在一些實施例中，該抗 GCC 抗原結合劑包含具有表 1 中

提供的 CDR2 的重鏈可變區。在一些實施例中，該抗 GCC 抗原結合劑包含具有表 1 中提供的 CDR3 的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 GCC 抗原結合劑包含具有表 1 中提供的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的重鏈可變區。在一些實施例中，抗 GCC 抗原結合劑包含表 1 中提供的一或多個 CDR 序列，其中該 CDR 包含 1、2 或 3 個胺基酸取代。在一實施例中，該取代不會不利地影響結合劑與其標靶之結合。

表 1. 例示性抗 GCC CDR 序列

	HCDR1	**HCDR2**	**HCDR3**
V1	HYYWS (SEQ ID NO: 8)	RIYPSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)	DRSTGWSEWNSDL (SEQ ID NO: 16)
V1-01	HYYWS (SEQ ID NO: 8)	RIYPSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)	DRSTGWSEWNSDL (SEQ ID NO: 16)
V5	RYWMS (SEQ ID NO: 9)	KIRHDGGEKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 12)	DYTRDV (SEQ ID NO: 17)
V36	RYWMT (SEQ ID NO: 10)	KIKYDGSEKYYADSVKG (SEQ ID NO: 13)	DYNKDY (SEQ ID NO: 18)
V48	RYWMT (SEQ ID NO: 10)	KIRHDGGEKYYPDSVKG (SEQ ID NO: 14)	DYNKDL (SEQ ID NO: 19)
V51	RYWMT (SEQ ID NO: 10)	KIRHDGGEKYYADSVKG (SEQ ID NO: 15)	DYNKDY (SEQ ID NO: 18)

【0176】　非完整抗體的抗 GCC 抗體亦可用於本發明。此類抗體可衍生自上述任何抗體。此類可使用的抗體分子包括(i)Fab 片段，即由 VL、VH、CL 和 CH1 域組成的單價片段；(ii)一 $F(ab')_2$ 片段，此為一個二價片段，包含在鉸鏈區

經雙硫鍵連接的兩個 Fab 片段；(iii)由 VH 和 CH1 域組成的 Fd 片段；(iv)由抗體單臂的 VL 和 VH 域組成的 Fv 片段，(v)dAb 片段(Ward 等人，*Nature* 341:544-546 (1989))，其由 VH 域組成；(vii)單域功能性重鏈抗體，其由 VHH 域(稱為奈米抗體)組成，請參見例如 Cortez-Retamozo 等人，*Cancer Res.* 64: 2853-2857 (2004)，以及引用於此的參考文獻；(vii)經分離的 CDR，例如一或多個經分離的 CDR 與足夠的框架一起提供一抗原結合片段。此外，雖然 Fv 片段的兩個域 VL 和 VH 由不同的基因編碼，但可使用重組方法藉由合成連接子將它們連接起來，使它們能夠成為單一蛋白鏈，其中 VL 和 VH 區配對形成單價分子(稱為單鏈 Fv(scFv)；請參見例如，Bird 等人，*Science* 242:423-426 (1988)；以及 Huston 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)。此類單鏈抗體亦包含在術語抗體的「抗原結合片段」內。這些抗體片段是使用本領域技術人員已知的常規技術獲得，並以與完整抗體相同的方式進行效用篩選。抗體片段，例如 Fv、$F(ab')_2$ 和 Fab 可藉由切割完整蛋白質(例如藉由蛋白酶或化學切割)而製備。

單域抗體

【0177】 單域抗體(sdAb)與傳統 4-鏈抗體的不同之處在於具有單一單體抗體可變域。例如，駱駝科動物和鯊魚產生稱為僅具重鏈之抗體(HcAbs)的 sdAb，其天生缺乏輕鏈。駱駝源化僅具重鏈之抗體的每一臂中的抗原結合片段，具有單一重鏈可變域(VHH)，它可以在沒有輕鏈幫助的情況下對抗原具有高親和力。駱駝源化 VHH 被稱為最小的功能性抗原結合片段，分子量約為 15 kD。在一些實施例中，該抗原結合劑為單一人類重鏈可變域(VH)抗體。此種結合分子也稱為 Humabody®且在本文中可互換使用。Humabody®為 Crescendo Biologics 有限公司的註冊商標。

【0178】 本申請案之一態樣係提供一種特異性結合至 GCC(例如人類 GCC)的經分離單域抗體(本文稱為「抗 GCC sdAb」)。在一些實施例中，抗 GCC sdAb 調節 GCC 活性。在一些實施例中，抗 GCC sdAb 為拮抗劑抗體。進一步提供衍

生自本文描述的任一抗 GCC sdAb 的抗原結合片段，以及包含本文描述的任一抗 GCC sdAb 的抗原結合蛋白。在一些實施例中，該抗 GCC sdAb 包含表 1 中提供的一、二及/或三個 CDR 序列。例示性抗 GCC sdAb 列於表 2 和 3 中。在一些實施例中，該抗 GCC sdAb 包含表 2 或表 3 中提供的可變重鏈。

【0179】 在一些實施例中，一些或所有的 CDR 序列、重鏈，可用於另一抗原結合劑中，例如用於 CDR 嫁接、人源化或嵌合性抗體分子中。實施例包括一抗體分子，其包含足夠的 CDR，例如來自上述重鏈可變區之一的所有三個 CDR，以允許結合至細胞表面的 GCC。

【0180】 在一些實施例中，該 CDR，例如所有的 HCDR，被嵌入人類或人類衍生的框架區中。人類框架區的實例包括人類生殖系(germline)框架序列、已親和力成熟化(體內或體外)的人類生殖系序列，或合成的人類序列，例如共通序列。在一實施例中，該重鏈框架為 IgG1 或 IgG2 框架。

【0181】 在一些實施例中，本發明的抗 GCC 抗原結合劑包含表 2 中提供的重鏈可變區胺基酸序列。在一些實施例中，該抗 GCC 抗原結合劑為僅具單域重鏈的抗體(例如，不包含免疫球蛋白輕鏈的抗原結合劑)。

表 2. 例示性重鏈可變區(VH)胺基酸序列

描述	VH 胺基酸序列
V1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMS VDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWS EWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)
V1-01	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMS VDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWS EWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWM

	SWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYT RDVWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 21)
V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYN KDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)
V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGR FTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDY NKDLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDY NKDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)

【0182】 在一些實施例中，本發明的抗 GCC 抗原結合劑包含一重鏈可變區胺基酸序列，其與表 2 中提供的 VH 序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致。在一些實施例中，VH 抗 GCC 抗原結合劑(例如，單域抗體)包含一前導序列。在一些實施例中，該 VH 抗 GCC 抗原結合劑包含一前導序列，其包含 MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6)、MELGLSWVFLVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)或 MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 42)。在一些實施例中，該 VH 抗 GCC 抗原結合劑包含一前導序列，其包含 MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 45)。

【0183】 在一些實施例中，本發明的抗 GCC 抗原結合劑包含一重鏈可變區胺基酸序列，其與表 3 中提供的 VH 序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致。在一些實施例中，本發明的抗 GCC 抗原

結合劑包含一重鏈可變區胺基酸序列，其與表 3 中提供的 VH 序列一致。

【0184】　在一些實施例中，該 VH 抗 GCC 抗原結合劑(例如，單域抗體)包含一前導序列，其條件為與表 3 中提供者至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致。在一些實施例中，該 VH 抗 GCC 抗原結合劑(例如，單域抗體)包含表 3 中提供之一前導序列。

表 3. 例示性重鏈可變區(VH)胺基酸序列

	前導序列	VH 序列
V1	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)
V1-01	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6)	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
V5	MELGLSWVFLVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 21)
V8	MELGLSWVFLVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDTGVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 22)
V9	MELGLSWVFLVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 23)
V30	MELGLSWVFL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSW

	VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	VRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
V31	MEFGLSWVFL VAIIKGVQC (SEQ ID NO: 42)	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
V36	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 26)
V48	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSR DNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
V51	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)

【0185】 用於體內治療或診斷用途的抗體片段可受益於增進其血清半衰期的修飾。適用於增加該抗體的體內血清半衰期的有機部分可包括一、二或更多個直線或分支片段，選自於：親水性聚合物基團(例如，直線或分支聚合物(例如，聚烷二醇如聚乙二醇、單甲氧基-聚乙二醇及類似物)、醣類(例如葡聚醣、纖維素、多醣及類似物)、親水性胺基酸的聚合物(例如聚離胺酸、聚天冬胺酸及類似物)、聚烷類氧化物和聚乙烯吡咯烷酮)、脂肪酸基團(例如單羧酸或二羧酸)、脂肪酸酯基團、脂質基團(例如二醯基甘油基團、神經鞘脂基團(例如神經醯胺基))或磷脂基團(例如，磷脂醯乙醇胺基團)。較佳地，該有機部分結合至預定位

點，在該處有機部分不會損害所得免疫共軛物的功能(例如，降低抗原結合親和力)，與未共軛抗體部分相較。該有機部分可具有約 500 Da 至約 50,000 Da，較佳約 2000、5000、10,000 或 20,000 Da 的分子量。以有機部分修飾多肽(例如抗體)的實例和方法可見於例如美國專利號 4,179,337 和 5,612,460、PCT 公開號 WO 95/06058 和 WO 00/26256，以及美國專利申請公開號 20030026805。

嵌合性抗原受體

【0186】 嵌合性抗原受體(CAR)為包含三個必要單元的雜合分子：(1)一細胞外抗原結合模體，(2)連接/跨膜模體，以及(3)細胞內 T 細胞信號模體(Long A H, Haso W M, Orentas R J. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. Oncoimmunology. 2013; 2 (4):e23621)。在本文揭示的 GCC 特異性 CAR 的各種實施例中，一般流程示於圖 1 中。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 從 N 端到 C 端包含一信號或前導胜肽、抗原結合域、跨膜及/或鉸鏈域、共刺激域和細胞內域。

【0187】 本發明提供包含一 CAR (例如，CAR 多肽)，其包含一抗 GCC 結合域(例如，如本文所述的 GCC 結合域)、一跨膜域、和一細胞內信號傳導域，且其中該抗 GCC 結合域包含在表 1 或 8 中列出的任何抗 GCC 重鏈結合域胺基酸序列之一重鏈互補決定區 1 (HC CDR1)、一重鏈互補決定區 2 (HC CDR2)和一重鏈互補決定區 3 (HC CDR3)。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 從 N 端到 C 端包含一信號或前導胜肽、抗 GCC VH、CD28 跨膜和鉸鏈、CD28 共刺激域和 CD3ζ 細胞內域。

【0188】 該抗原結合域可為與該抗原結合的任何蛋白質，包括但不限於單株抗體、多株抗體、重組抗體、人類抗體、人源化抗體及其功能片段，包括但不限於：單域抗體，例如重鏈可變域(VH)、輕鏈可變域(VL)和駱駝源衍生奈米抗體的可變域(VHH)，以及替代骨架，其在本領域中已知可作為抗原結合域，例如重組纖連蛋白域及類似物。在一些實施例中，該抗原結合域

【0189】 CAR 的抗原結合模體通常在單鏈片段可變域(ScFv)、免疫球蛋白(Ig)

分子的最小結合域或單域抗體之後形成(例如，WO2018/028647A1)。替代的抗原結合模體，例如受體配體(即，IL-13 已被改造為與腫瘤表現 IL-13 受體結合)、完整的免疫受體、基因庫衍生的胜肽、和先天免疫系統效應子分子(例如 NKG2D)亦經改造。對於定義出最具 CAR 載體轉導活性的 T 細胞群、決定最佳培養和擴增技術、以及定義出 CAR 蛋白結構本身的分子細節方面，仍然是相當重要的工作。

【0190】 CAR 的連接模體可為相對穩定的結構域，例如 IgG 的恆定域，或被設計為延伸的彈性連接子。在一些實施例中，抗 GCC 結合域(例如，包含表 1 或表 7 中提供的序列之多肽)經由連接子(例如本文所述的連接子)連接至該跨膜域。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包括一(Gly4-Ser)n 連接子，其中 n 為 1、2、3、4、5 或 6(SEQ ID NO: 72)。在一些實施例中，該連接子包含 RAAA (SEQ ID NO: 53)之胺基酸序列。

【0191】 結構模體，例如衍生自 IgG 恆定域者，可用於將 ScFv 結合域延伸遠離 T 細胞膜表面。這對於結合域特別靠近腫瘤細胞表面膜的某些腫瘤標靶可能很重要(例如二唾液酸神經節苷脂 GD2；Orentas 等人，未發表的觀察)。迄今為止，CAR 中使用的信號模體始終包括 CD3-ζ 鏈，因為此核心模體是 T 細胞活化的關鍵信號。首個報導的第二代 CAR 具有 CD28 信號傳導域和 CD28 跨膜序列。此模體也用於包含 CD137 (4-1BB)信號模體的第三代 CAR 中(Zhao Y 等人，J Immunol. 2009; 183 (9): 5563-74)。隨著新技術的出現，以與抗-CD3 和抗-CD28 抗體連結的微珠活化 T 細胞，以及來自 CD28 的經典「信號 2」的出現，不再需要由 CAR 本身編碼。使用微珠活化，發現第三代載體在體外試驗中並不優於第二代載體，且它們在白血病小鼠模型中沒有明顯優於第二代載體(Haso W, Lee D W, Shah N N, Stetler-Stevenson M, Yuan C M, Pastan I H, Dimitrov D S, Morgan R A, FitzGerald D J, Barrett D M, Wayne A S, Mackall C L, Orentas R J. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, Blood. 2013; 121 (7):1165-74; Kochenderfer J N 等人，Blood. 2012; 119 (12):2709-

20)。第二代 CD28/CD3-ζ 中的 CD19 特異性 CAR (Lee D W 等人，American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, La.; Dec. 7-10, 2013)和 CD137/CD3-ζ信號格式(Porter D L 等人，N Engl J Med. 2011; 365 (8): 725-33)的臨床成功證明了這一點。除了 CD137，其他腫瘤壞死因子受體超級家族成員如 OX40 也能夠在 CAR 轉導的 T 細胞中提供重要的持續信號(Yvon E 等人，Clin Cancer Res. 2009; 15(18):5852-60)。同樣重要的是培養 CAR T 細胞群的培養條件。

【0192】 基於 T 細胞之免疫療法已成為合成生物學的新前沿；多重啟動子及基因產物設計為使這些高活性細胞轉向腫瘤微環境，其中 T 細胞可避開負面的調節信號且介導有效腫瘤毒殺。通過用 AP1903 對誘導型凋亡蛋白酶 9 (caspase 9)進行藥物誘導可消除不需要的 T 細胞，其顯現出一種以藥理學方式啟動控制 T 細胞群的強力開關之方法(Di Stasi A 等人，N Engl J Med. 2011; 365(18):1673-83)。因此，雖然 CAR 呈現出可觸發 T 細胞活化，其方式類似於內源性 T 細胞受體，但迄今為止，此技術的臨床應用的主要阻礙在於 CAR+ T 細胞的體內擴增有限、在輸注後細胞快速消失、以及令人失望的臨床活性。因此，此項技術中存在一種迫切且長期的需要，需要找出以可展現具體且有效的抗腫瘤效果而無前述缺點(亦即高毒性、療效不足)之方式治療癌症之新穎組成物及方法。

【0193】 本發明藉由提供可用於治療癌症及其他疾病及/或病況的 CAR 組成物及治療方法來滿足此等需求。尤其是，如本文所揭示及描述，本發明提供一種 CAR，其可用於治療與 GCC 之失調表現相關之疾病、病症或病況，且該 CAR 含有 GCC 抗原結合域，其在經轉導 T 細胞上展現高表面表現、展現高度細胞溶解性、及經轉導 T 細胞之體內擴增及持續性。

【0194】 在一些實施例中，該抗 GCC 抗原結合劑為嵌合抗原受體(CAR)。CAR 之特徵包括其以非 MHC 限制之方式，將 T 細胞特異性及反應性重新導向至所選目標，及利用單株抗體之抗原結合特性的能力。非 MHC 限制性抗原辨識使表現 CAR 之 T 細胞有能力辨識出與抗原加工無關之抗原，因此繞過腫瘤逃

逸之主要機制。此外，當在 T 細胞中表現時，CAR 會有利地不使外源性 T 細胞受體(TCR)α 及 β 鏈進行二聚化。

細胞外域

【0195】 如本文中所描述，CAR 包含一目標特異性結合元件(例如，抗 GCC 抗原結合劑之至少一部分)，否則稱為抗原結合域或部分。域之選擇取決於定義標靶細胞表面之配位體的種類及數目。舉例而言，該抗原結合域可經選擇，以辨識作為與特定疾病狀態(例如，癌症)相關之標靶細胞上的細胞表面標記物之配位體(例如，GCC)。因此，在 CAR 中可作為抗原結合域之配位體的細胞表面標記物之實例包括與病毒性、細菌性及寄生蟲感染、自體免疫疾病及癌細胞相關者。

【0196】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 之細胞外域包含一抗原結合劑，其包含表 1 中所提供之至少一個 CDR。在一些實施例中，本發明的抗 GCC 抗原結合劑包含一重鏈可變區胺基酸序列，其與表 2 或表 3 中提供的 VH 序列至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 的細胞外域包含一表 2 中提供的可變重鏈。在一些實施例中，該抗 GCC CAR 的細胞外域包含一表 3 中提供的可變重鏈。

跨膜域

【0197】 關於跨膜域，在各種實施例中，CAR 可被設計為包含一連接到 CAR 的胞外域(例如，抗 GCC 抗原結合域)的跨膜域。跨膜域可包括與該跨膜區相鄰的一或多個額外胺基酸，例如與衍生該跨膜區的蛋白質的胞外區相關的一或多個胺基酸(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 至多達 15 個胺基酸的細胞外區域)、及/或與衍生該跨膜蛋白的蛋白質的細胞內區域相關的一或多個額外胺基酸(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 至多達 15 個胺基酸的細胞內區域)。

【0198】 在一態樣中，該跨膜域是與所使用的 CAR 的其他域之一相關者。

在一些情況下，該跨膜域可經由胺基酸取代來選擇或修飾，以避免此類域與該相同或不同表面膜蛋白的跨膜域結合，例如使與該受體複合物的其他成員的相互作用最小化。在一態樣中，該跨膜域能夠與表現 CAR 的細胞(例如 CART 細胞)表面上的另一 CAR 進行同型二聚化。在一不同態樣中，該跨膜域的胺基酸序列可經修飾或取代，以使與該相同之表現 CAR 的細胞(例如 CART)中存在的天然結合配偶體(partner)的結合域相互作用最小化。

【0199】 如本文所述，該 CAR 包含一跨膜域。關於跨膜域，該 CAR 包含與 CAR 的細胞外 GCC 抗原結合域融合的一或多個跨膜域。該跨膜域可衍生自天然或合成來源。若來源是天然的，則該域可衍生自任何膜-結合蛋白或跨膜蛋白。

【0200】 用於本文所述之 CAR 中之跨膜區可衍生自(亦即，包含至少以下跨膜區)T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、間皮素(mesothelin)、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。

【0201】 該跨膜域可衍生自天然或重組來源。若來源是天然的，則該域可衍生自任何膜-結合蛋白或跨膜蛋白。在一態樣中，當 CAR 已結合至目標時，該跨膜域可向細胞內域發送信號。特別可用於本發明之跨膜域可包括至少如以下之跨膜域：例如 T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8 (如 CD8α、CD8β)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在一些實施例中，該跨膜域可包括至少共刺激分子之跨膜域，例如：MHC 第 I 類分子、TNF 受體蛋白、類似免疫球蛋白的蛋白質、細胞激素受體、整聯蛋白(integrin)、信號傳導淋巴球活化分子(SLAM 蛋白)、活化 NK 細胞受體、BTLA、Toll 配位體受體、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CDlla/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、

CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CDIId、ITGAE、CD103、ITGAL、CDIIa、LFA-1、ITGAM、CDIIb、ITGAX、CDIIc、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Lyl08)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、及特異性地與 CD83 結合之配位體。

【0202】 在一些實施例中，該 CAR 分子包含一蛋白質之跨膜域，選自由以下組成之群：T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 和 CD154。

【0203】 或者，該跨膜域可為合成性，在此情況下，它將主要包含疏水性殘基，例如白胺酸和纈胺酸。在一些實施例中，在合成性跨膜域的每一端會發現苯丙胺酸、色胺酸和纈胺酸的三聯體。視情況，短寡-或多肽連接子，長度較佳在 2 到 10 個胺基酸之間，可形成跨膜域和 CAR 的細胞質信號傳導域之間的連結。在一些實施例中，該連接子為甘胺酸-絲胺酸雙聯體或丙胺酸三聯體連接子。

【0204】 在一些實施例中，除了如前述之跨膜域之外，亦使用天然地與 CAR 的結構域之一結合的跨膜域。在一些實施例中，該跨膜域可藉由胺基酸取代來選擇，以避免此類域與相同或不同表面膜蛋白的跨膜域結合，藉此使與該受體複合物的其他成員的相互作用最小化。

【0205】 在一些實施例中，本發明之 CAR 中之跨膜域為 CD28 跨膜域。在一些實施例中，該 CD28 跨膜域包含 FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV SEQ ID NO: 30 之核酸序列。在一些實施例中，CD28 跨膜結構域包含編碼 SEQ ID NO: 30 的胺基酸序列的核酸序列。在一些實施例中，該跨膜結構域包含一序列，其具有 SEQ ID NO: 30 的胺基酸序列之至少一、二或三個修飾(例如，取代)，

但不超過 20、10 或 5 個修飾(例如，取代)，或與 SEQ ID NO: 30 的胺基酸序列至少 95%、96%、97%、98%或 99%一致。

【0206】 在一些實施例中，跨膜結構域可經由一鉸鏈(例如來自人類蛋白質的鉸鏈)連接到 CAR 的細胞外域(例如 CAR 的抗原結合域)。舉例而言，在一實施例中，該鉸鏈可為人類 Ig(免疫球蛋白)鉸鏈，例如 IgG4 鉸鏈或 CD8a 鉸鏈。

【0207】 在 CAR 中，間隔子域(亦稱為鉸鏈域)可配置在細胞外域與跨膜域之間，或配置在細胞內域與跨膜域之間。間隔子域意謂任何作為連接跨膜域與細胞外域及/或跨膜域與細胞內域之寡胜肽或多胜肽。間隔子域包含至多 300 個胺基酸，較佳 10 至 100 個胺基酸，且最佳 25 至 50 個胺基酸。

【0208】 在數個實施例中，該連接子可包括間隔子元件，當存在時，以增加連接子之大小，使得效應分子或可偵測標記與抗體或抗原結合片段之間的距離增加。例示性間隔子為一般技術人員所已知，且包括於美國專利號 7,964,566、7,498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444、及 4,486,414，以及美國專利 公開號 20110212088 和 20110070248 中所列者，其每一者皆以全文引用之方式併入本文中。

【0209】 該間隔子域較佳具有促進 CAR 與抗原之結合及提高傳導至細胞中之信號的序列。預期促進結合之胺基酸實例包括半胱胺酸、帶電胺基酸、及潛在醣基化位點中之絲胺酸及蘇胺酸，且此等胺基酸可作為構成該間隔子域之胺基酸。

【0210】 在一些實施例中，該 CAR 包含一鉸鏈域。在一些實施例中，該鉸鏈域包含 IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP (SEQ ID NO: 29)之核酸序列。在一些實施例中，該鉸鏈域包含編碼 SEQ ID NO: 29 的胺基酸序列之核酸序列。在一些實施例中，該絞鏈域包含一序列，其具有 SEQ ID NO: 29 的胺基酸序列之至少一、二或三個修飾(例如，取代)，但不超過 20、10 或 5

個修飾(例如，取代)，或與 SEQ ID NO: 29 的胺基酸序列至少 95%至 99%一致。

【0211】 在一些實施例中，該 CAR 包含一 CD8 鉸鏈域。在一些實施例中，鉸鏈域包含胺基酸序列 TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 5)。在一些元素中，該 CAR 包含一 CD8 跨膜域。在一些實施例中，該跨膜域包含胺基酸序列 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 2)。在一些實施例中，該鉸鏈及跨膜域係衍生自同一分子。在其他實施例中，該鉸鏈及跨膜域係衍生自不同分子(例如，CD8 融合至 CD28)。在一些實施例中，該 CAR 包含一鉸鏈域。在一些實施例中，該鉸鏈域包含 IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 31)之核酸序列。在一些實施例中，該鉸鏈域包含編碼 SEQ ID NO: 31 的胺基酸序列之核酸序列。在一些實施例中，該絞鏈域包含一序列，其具有 SEQ ID NO: 31 的胺基酸序列之至少一、二或三個修飾(例如，取代)，但不超過 20、10 或 5 個修飾(例如，取代)。

【0212】 在一實施例中，該 CAR 包含一編碼表皮生長因子受體之截短序列(tEGFR)的標籤序列。在一些實施例中，該 tEGFR 標籤包含 SEQ ID NO: 43 的胺基酸序列，或與其至少 95%、96%、97%、98%或 99%一致的序列。

細胞內域

【0213】 CAR 的細胞質域或細胞內信號傳導域負責活化已有 CAR 的免疫細胞的至少一種正常效應子功能。術語「效應子功能」是指細胞的特殊功能。例如，T 細胞的效應子功能可為細胞溶解活性或輔助活性，包括細胞因子的分泌。因此，術語「細胞內信號傳導域」是指轉導效應子功能信號並指導細胞執行特定功能的蛋白質之一部分。雖然通常可以使用完整細胞內信號傳導域，但在許多情況下沒有必要使用整個鏈。就使用細胞內信號傳導域的截短部分而言，此類截短部分可用於代替完整鏈，只要它能轉導效應子功能信號即可。因此，術語「細胞內信號傳導域」意在包括足以轉導效應子功能信號的細胞內信號傳導

域的任何截短部分。

【0214】 用於 CAR 的細胞內信號傳導域的實例包括 T 細胞受體(TCR)和共受體的細胞質序列，其共同作用以在抗原受體接合後啟動信號轉導，以及這些序列的任何衍生物和變異體，和任何具有相同功能的合成序列。僅通過 TCR 產生的信號不足以完全活化 T 細胞，還需要次級或共刺激信號。因此，T 細胞活化可視為由兩種不同類型的細胞質信號序列介導的：經由 TCR(初級細胞質信號序列)啟動抗原依賴性初級活化者，以及以非抗原-依賴性的方式發揮作用，以提供次級或共刺激信號(次級細胞質信號序列)。

【0215】 初級細胞質信號序列以刺激方式或抑制方式調節 TCR 複合物的初級活化。以刺激方式作用的初級細胞質信號序列可能包含信號模體，這些模體被稱為免疫受體酪胺酸-基礎活化模體或 ITAM。在一些實施例中，CAR 內的含 ITAM 域涵蓋與內源性 TCR 複合物無關之初級 TCR 信號傳導。在一態樣中，該初級信號由例如 TCR/CD3 複合物與裝載有胜肽的 MHC 分子結合引發，並導致 T 細胞反應之介導，包括但不限於增殖、活化、分化及類似作用。以刺激方式作用的初級細胞質信號序列(亦稱為「初級信號傳導域」)可包含稱為免疫受體酪胺酸-基礎活化模體或 ITAM 的信號模體。

【0216】 本文揭示的含有特別用於 CAR 之初級細胞質信號傳導序列的 ITAM 實例包括衍生自 TCRζ (CD3ζ)、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b 及 CD66d 者。特別地，ITAM 之非限制性實例包括具有 CD3ζ 胺基酸序列編號 51 至 164 之胜肽。(NCBI RefSeq: NP.sub.--932170.1)，Fcε.RI.γ 之胺基酸編號 45 至 86。(NCBI RefSeq: NP.sub.--004097.1)，Fcε.RI.β 之胺基酸編號 201 至 244。(NCBI RefSeq: NP.sub.--000130.1)，CD3γ 之胺基酸編號 139 至 182。(NCBI RefSeq: NP.sub.--000064.1)，CD3δ 之胺基酸編號 128 至 171。(NCBI RefSeq: NP.sub.--000723.1)，CD3ε 之胺基酸編號 153 至 207。(NCBI RefSeq: NP.sub.--000724.1)，CD5 之胺基酸編號 402 至 495 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2)、0022 之胺基酸編號 707 至 847 (NCBI RefSeq: NP.sub.--

001762.2)、CD79a 之胺基酸編號 166 至 226 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001774.1)、CD79b 之胺基酸編號 182 至 229 (NCBI RefSeq: NP.sub.--000617.1)、及 CD66d 之胺基酸編號 177 至 252 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001806.2)、以及與這些胜肽具有相同功能的變異體。基於本文所述之 NCBI RefSeq ID 或 GenBank 之胺基酸序列資訊的胺基酸編號，係基於每一蛋白質之前驅體(包含一信號胜肽序列等)的全長來編號。

【0217】 在實施例中，該細胞內信號域轉導效應子功能信號並指導細胞執行特定功能。雖然可使用完整細胞內信號傳導域，但在許多情況下沒有必要使用整條鏈。就使用細胞內信號傳導域的截短部分而言，此類截短部分可用於代替完整鏈，只要它能轉導效應子功能信號即可。因此，術語「細胞內信號傳導域」意在包括足以轉導效應子功能信號的細胞內信號傳導域的任何截短部分。

【0218】 細胞內信號傳導域會產生一種信號，其可促進含 CAR 之細胞(例如，CART 細胞)的免疫效應子功能。免疫效應子功能之實例，例如，在 CART 細胞中，包括細胞溶解活性及輔助子活性，包括細胞激素之分泌。

【0219】 在一實施例中，細胞內信號傳導域可包含初級細胞內信號傳導域。例示性初級細胞內信號傳導域包括衍生自負責初級刺激或抗原依賴性刺激的分子者。在一實施例中，該細胞內信號傳導域可包含一共刺激細胞內域。例示性共刺激細胞內信號傳導域包括衍生自負責共刺激信號或非抗原依賴性刺激的分子者。例如，在 CART 的情況下，初級細胞內信號傳導域可包含 T 細胞受體的細胞質序列，而共刺激細胞內信號傳導域可包含來自共受體或共刺激分子的細胞質序列。

【0220】 在一些實施例中，該初級細胞質信號傳導序列包括，衍生自 CD3ζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278 (亦稱為「ICOS」)、FceRI、CD66d、DAP10 及 DAP12 者。在一實施例中，CAR 之細胞質信號傳導分子包含一衍生自 CD3ζ 之細胞質信號傳導序列。

【0221】 在一實施例中，初級信號傳導域包含一經修飾的 ITAM 域，例如，

與天然ITAM域相較，具有改變(例如增加或降低)活性的突變ITAM域。在一實施例中，初級信號傳導域包含經修飾的含 ITAM 初級細胞內信號傳導域，例如最佳化及/或截短的含 ITAM 初級細胞內信號傳導域。在一實施例中，初級信號傳導域包括一、二、三、四或更多個 ITAM 模體。

【0222】 在一些實施例中，CAR之細胞內域可經設計以包含CD3-ζ信號傳導域本身，或與有關CAR的內文中可用的任何其他所需之細胞內信號傳導域結合。例如，CAR 之細胞內域可包含一 CD3ζ 鏈部分及一共刺激信號傳導區。該共刺激信號傳導區係指包含共刺激分子之細胞內域的CAR之一部分。共刺激分子為抗原受體或其配位體以外之細胞表面分子，其為淋巴細胞對抗原產生有效反應所必需。此類共刺激分子之實例包括 CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、及特異地與 CD83 結合之配位體、及類似者。在一些實施例中，該共刺激域包含一蛋白質的功能性信號傳導域，選自由以下組成之組：0X40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CDlla/CD18)及 4-1BB (CD137)。

【0223】 特別地，此類共刺激分子之非限制性實施例包括具有下列序列之胜肽：CD2之胺基酸編號236至351 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001758.2)、CD4之胺基酸編號421至458 (NCBI RefSeq: NP.sub.--000607.1)、CD5之胺基酸編號402至495 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2)、CD8α之胺基酸編號207至235 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3)、CD83之胺基酸編號196至210 (GenBank: AAA35664.1)、CD28之胺基酸編號為181至220 (NCBI RefSeq： NP.sub.-006130.1)、CD137之胺基酸編號為214至255 (4-1BB，NCBI RefSeq: NP.sub.--001552.2)、CD134之胺基酸編號241至277 (OX40，NCBI RefSeq: NP.sub.--003318.1)、及ICOS之胺基酸編號166至199 (NCBI RefSeq: NP.sub.--036224.1)、以及與這些胜肽具有相同功能的變異體。因此，雖然本發明主要使用 4-1BB 作為共刺激信號傳導元件範例，但其他共刺激信息傳導元件亦落於本發明的範疇

中。

【0224】 CAR 之細胞內信號傳導域可包含初級信號傳導域，例如 CD3ζ 信號傳導域本身，或與本發明有關 CAR 的內文中可用的任何其他所需之細胞內信號傳導域結合。例如，CAR 之細胞內信號傳導域可包含一初級信號傳導域，例如 CD3ζ 鏈部分，及一共刺激信號域。該共刺激信號傳導域係指包含一共刺激分子之細胞內域的 CAR 的一部分。共刺激分子為抗原受體或其配位體以外之細胞表面分子，其為淋巴細胞對抗原產生有效反應所必需。此類分子之實例包括 MHC 第 I 類分子、TNF 受體蛋白、類似免疫球蛋白的蛋白質、細胞激素受體、整聯蛋白(integrin)、信號傳導淋巴球活化分子(SLAM 蛋白)、活化 NK 細胞受體、BTLA、Toll 配位體受體、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CDlla/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLAl、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CDlld、ITGAE、CD103、ITGAL、CDlla、LFA-1、ITGAM、CDllb、GG AC、CDllc、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Lyl08)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、及特異性地與CD83結合之配位體、以及類似物。舉例而言，已證實 CD27 共刺激可在體外提高人類 CART 細胞之擴增、效應子功能及存活，且在體內擴增人類 T 細胞之持續性及抗腫瘤活性(Song 等人，Blood. 2012; 119(3):696-706)。在本發明之 CAR 的細胞質部分中之細胞內信號傳導序列，可隨機或以指定順序彼此連接。

【0225】 CAR 之細胞質信號傳導部分中的細胞質信號傳導序列可隨機或以指定順序彼此連接。視情況，短寡-或多胜肽連接子，長度較佳在 2 到 10 個胺基酸之間，可形成該橋聯。在一些實施例中，該連接子為甘胺酸-絲胺酸雙聯體或丙胺酸三聯體連接子。

【0226】 在一些實施例中，該細胞內域可設計成包含一 CD28 共刺激信號傳導域。在一些實施例中，該 CAR 之細胞內域包含一胺基酸序列，其與 RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 32) 至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0227】 在一些實施例中，該細胞內域係設計成包含 CD3-ζ 的信號傳導域和 CD28 的信號傳導域。在一些實施例中，該細胞內域包含具有一或多個經修飾之免疫受體酪胺酸基礎活化模體(ITAM)的 CD3-ζ。在一些實施例中，該細胞內域包含一 CD3-ζ，其具有三個免疫受體酪胺酸基礎活化模體(ITAM)，其中第一個未經修飾，且第二和第三個 ITAM 經改變，名為「1XX」。在一些實施例中，該 CAR 之細胞內域包含一胺基酸序列，其與 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTF DALHMQALPPR (SEQ ID NO: 33)至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0228】 在另一實施例中，該細胞內域設計成包含 CD3-ζ之信號傳導域及 4-1BB 之信號傳導域。在又一實施例中，該細胞內域係設計成包含 CD3-ζ 的信號傳導域和 CD28 和 4-1BB 的信號傳導域。

【0229】 在一些實施例中，該 CAR 之細胞內域經設計，以包含 4-1BB 之信號傳導域及 CD3-ζ 之信號傳導域，其中 4-1BB 之信號傳導域包含 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 3)，且 CD3-ζ 之信號傳導域包含如 RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR

RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 4)或 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 71)所示之核酸序列。

【0230】 在一些實施例中，該 CAR 域藉由一多胜肽連接子連接。舉例而言，一多胜肽連接子的長度可介於 2 與 10 個胺基酸之間(例如，2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸)，可形成在細胞內信號傳導序列之間的橋聯。在一實施例中，甘胺酸-絲胺酸雙聯體可使用作為合適的連接子。在一些實施例中，可使用單一胺基酸，例如丙胺酸、甘胺酸作為合適的連接子。

【0231】 在一態樣中，該細胞內信號傳導域設計成包含二或多個，例如，2、3、4、5 或更多個共刺激信號傳導域。於一實施例中，該二或多個例如 2、3、4、5 或更多的共刺激信號傳導域，係由一連接子分子(例如本文所述之連接子分子)分隔。在一實施例中，該細胞內信號傳導域包含兩個共刺激信號傳導域。在一些實施例中，該連接子分子為甘胺酸殘基。在一些實施例中，該連接子為丙胺酸殘基。

【0232】 在一態樣中，該細胞內信號傳導域係設計成包含 CD3-ζ 之信號傳導域及 CD28 之信號傳導域。在一態樣中，該細胞內信號傳導域係設計成包含 CD3-ζ 之信號傳導域及 4-1BB 之信號傳導域。

【0233】 在一態樣中，該細胞內信號傳導域係設計成包含 CD3-ζ 之信號傳導域及 CD27 之信號傳導域。在一態樣中，該細胞內信號傳導域係設計成包含 CD3-ζ 之信號傳導域及 CD28 之信號傳導域。在 一態樣中，該細胞內信號傳導域係設計成包含 CD3-ζ 之信號傳導域及 ICOS 之信號傳導域

【0234】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與表 4 中所提供之胺基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0235】 *表 4. 例示性抗 GCC CAR 之胺基酸序列*

CAR	序列
V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASI SHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVS SRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLF QGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 48)
V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGF TFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSR AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLF QGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 49)
V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGF TFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSR AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLF QGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 50)

V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGF TFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSR DNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSR AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLF QGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 51)
V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSR AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLF QGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 52)
V1 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASI SHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPK NQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVS SRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFS EIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 47)

【0236】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID

No: 47 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0237】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 48 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0238】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 49 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0239】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 50 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0240】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 51 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

【0241】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 包含一胺基酸序列，其與 SEQ ID No: 52 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致。

CAR 的功能特徵

【0242】 本文中所揭示之 CAR 的功能部分亦明確包括在本發明範疇中。術語「功能部分」當用於指稱 CAR 時，係指本文中所揭露之一或多個 CAR 之任何部分或片段，該部分或片段保留該部分的 CAR (原 CAR)之生物活性。功能部分涵蓋例如 CAR 的彼等部分，其與原 CAR 保持辨識標靶細胞或偵測、治療或預防疾病之能力的程度相似、程度相同或程度較高。關於原 CAR，該功能部分可包含例如約 10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多的原 CAR。

【0243】 該功能部分可包含在該部分之胺基或羧基端或兩端處之額外胺基酸，其為在原 CAR 之胺基酸序列中並未發現的額外胺基酸。希望的是，該額外胺基酸不干擾該功能部分的生物功能，例如，辨識標靶細胞、偵測癌症、治療或預防癌症等。更理想地，與原 CAR 的生物活性相較，該額外胺基酸提高該生物活性。

【0244】 本發明的範圍包括本文中所揭露之 CAR 的功能變異體。如本文所

用，術語「功能變異體」係指具有與原 CAR 實質上或顯著的序列一致性或相似性之 CAR、多胜肽或蛋白質，該功能變異體保留由其變異之 CAR 的生物活性。功能變異體涵蓋例如本文所述之 CAR 的變異體(原 CAR)，其保持與原 CAR 程度相似、程度相同或程度較高之辨識標靶細胞的能力。相關於原 CAR，該功能變異體可與原 CAR 之胺基酸序列例如，至少約 30%、50%、75%、80%、90%、98%或更高一致。

【0245】 功能變異體可例如包含原 CAR 之胺基酸序列，其具有至少一保守性胺基酸取代。替代地或另外地，功能變異體可例如包含原 CAR 之胺基酸序列，其具有至少一非保守性胺基酸取代。在此案例中，非保守性胺基酸取代較佳地不干擾或抑制該功能性變異體之生物活性。非保守性胺基酸取代可提高該功能變異體之生物活性，使得功能變異體之生物活性較原 CAR 增加。

【0246】 該 CAR 之胺基酸取代較佳為保守性胺基酸取代。保守性胺基酸取代為本領域中已知的，且包括胺基酸取代，其中具有特定物理及/或化學性質之胺基酸係交換成具有相同或類似化學或物理性質之另一胺基酸。例如，該保守性胺基酸取代可為一酸性/負電荷極性胺基酸被另一酸性/負電荷極性胺基酸(如 Asp 或 Glu)取代、一帶有非極性側鏈之胺基酸被另一帶有非極性側鏈之胺基酸(如 Ala、Gly、Val、He、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val 等)取代、一鹼性/正電荷極性胺基酸被另一鹼性/正電荷極性胺基酸(如 Lys、His、Arg 等)取代、一帶有極性側鏈的不帶電胺基酸被另一帶有極性側鏈的不帶電胺基酸(如 Asn、Gin、Ser、Thr、Tyr 等)取代、一帶有 β 分支側鏈的胺基酸被另一帶有 β 分支側鏈的胺基酸(如 He、Thr 和 Val)取代、一帶有芳香側鏈的胺基酸被另一帶有芳香側鏈的胺基酸(如 His、Phe、Trp 和 Tyr)取代等。

【0247】 該 CAR 基本上可由本文所述之特定胺基酸序列或序列組成，使得其他成分(例如，其他胺基酸)不實質改變該功能變異體的生物活性。

【0248】 該 CAR (包括功能部分及功能變異體)可具有任何長度，亦即，可包含任何數量的胺基酸，條件為該 CAR (或其功能部分或功能變異體)保留其生物

活性，例如，特異結合至抗原之能力、偵測哺乳動物之患病細胞、或治療或預防哺乳動物之疾病等。例如，該 CAR 可為約 50 至約 5000 個胺基酸長度，諸如長度為 50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 或更多個胺基酸。

【0249】 該 CAR (包括本發明之功能性部分及功能變異體)可包含合成胺基酸代替一或多種天然存在之胺基酸。此類合成胺基酸為本領域中已知的，並包括例如：胺基環己烷羧酸、正亮胺酸、-胺基正癸酸、高絲胺酸、S-乙醯胺基甲基-半胱胺酸、反式-3-和反式-4-羥脯胺酸、4-胺基苯丙胺酸、4-硝基苯丙胺酸、4-氯苯丙胺酸、4-羧基苯丙胺酸、β-苯基絲胺酸 β-羥基苯丙胺酸、苯基甘胺酸、α-萘丙胺酸、環己基丙胺酸、環己基甘胺酸、二氫吲哚-2-羧酸、1,2,3,4-四氫異喹啉-3-羧酸、胺基丙二酸、胺基丙二酸單醯胺、N'-苄基-N'-甲基-離胺酸、N',N'-二苄基-離胺酸、6-羥基離胺酸、鳥胺酸、-胺基環戊烷羧酸、α-胺基環己烷羧酸、α-胺基環庚烷羧酸、α-(2-胺基-2-降冰片烷)-羧酸、γ-二胺基丁酸、β-二胺基丙酸、高苯丙胺酸和 α-第三-丁基甘胺酸。

【0250】 該 CAR (包括功能部分及功能變異體)可經醣基化、醯胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-醯化、經由例如雙硫橋聯環化、或轉化為酸加成鹽及/或視情況二聚合化或聚合化或共軛。

取代和變異

【0251】 在一些實施例中，其涵蓋了本文提供的抗體之胺基酸序列變異體。例如，可能希望增進抗體的結合親和力及/或其他生物學特性。抗體的胺基酸序列變異體可藉由引入適當的修飾至編碼該抗體的核酸序列中、或藉由胜肽合成而製備。此類修飾包括，例如，抗體胺基酸序列內殘基的刪去及/或插入及/或取代。可進行刪去、插入和取代的任何組合，以完成最終構建體，條件為該最終構建體具有希望的特徵，例如抗原結合。

a)取代、插入和刪除變異

【0252】 在一些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代的抗體變異體。進行取代突變的有興趣位點包括 HVR 和 FR。以下進一步描述胺基酸側鏈類別。可將胺基酸取代引入至有興趣的抗體中，並將產物進行希望之活性篩選，例如抗原結合度維持/增進、免疫原性降低、或 ADCC 或 CDC 增進。

【0253】 胺基酸可根據共同側鏈特性來分組：

【0254】 (1)疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

【0255】 (2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

【0256】 (3)酸性：Asp、Glu；

【0257】 (4)鹼性：His、Lys、Arg；

【0258】 (5)影響鏈位向之殘基：Gly、Pro；

【0259】 (6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

【0260】 非保守性取代係為將這些類別之一的成員交換為另一類別。

【0261】 在一些態樣中，該抗原結合域為人源化。非人類抗體為人源化，其中該抗體的特定序列或區域經修飾，以增加與在人類中天然產生的抗體或其片段的相似性。在一態樣中，該抗原結合域為人源化。人源化抗體(或抗原結合片段)可使用本領域中已知的各種技術產生，包括但不限於：CDR 嫁接(請參見例如歐洲專利號 EP 239,400；國際公開號 WO 91/09967；和美國專利號 5,225,539、5,530,101 和 5,585,089，其每一者係以全文引用之方式併入本文中)、飾面或表面重修(請參見，例如，歐洲專利號 EP 592,106 和 EP 519,596；Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka等人，1994, Protein Engineering, 7(6):805-814；以及 Roguska 等人，1994, PNAS, 91:969-973，其每一者係以全文引用之方式併入本文中)、鏈改組(請參見例如美國專利號 5,565,332，其係以全文引用之方式併入本文中)，以及揭示於例如美國專利申請公開號 US2005/0042664、美國專利申請公開號 US2005/0048617、美國專利號 6,407,213、美國專利號 5,766,886、國際專利公開號 WO 9317105、Tan 等人，J. Immunol., 169:1119-25 (2002)、Caldas 等人，Protein Eng., 13(5):353-60 (2000)、Morea 等人，

Methods, 20(3):267-79 (2000)、Baca 等人，J. Biol. Chem., 272(16): 10678-84 (1997)、Roguska 等人，Protein Eng., 9(10):895-904 (1996)、Couto 等人，Cancer Res., 55 (23 增刊):5973s-5977s (1995)、Couto 等人，Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995)、Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)、以及 Pedersen 等人，J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)，其每一者係以全文引用之方式併入本文中。通常，框架區中的框架殘基將被來自於 CDR 供體抗體的相對應殘基取代，以改變(例如增進)抗原結合。這些框架取代，例如保守取代是藉由本領域中眾所周知的方法辨識出，例如，藉由對 CDR 和框架殘基的相互作用進行模擬，以辨識出對於抗原結合和序列比對重要的框架殘基，以辨識出在特定位置的不尋常框架殘基。(請參見例如，Queen 等人，美國專利號 5,585,089；以及 Riechmann 等人，1988, Nature, 332:323，其係以全文引用之方式併入本文中)

【0262】 人源化抗體或抗體片段具有一或多個來自非人類來源的胺基酸殘基保留在其中。這些非人類胺基酸殘基通常稱為「輸入」殘基，通常取自「輸入」可變域。如本文所提供，人源化抗體或抗體片段包含來自非人類免疫球蛋白分子和框架區的一或多個 CDR，其中包含該框架的胺基酸殘基完全或大部分衍生自人類生殖系。用於抗體或抗體片段人源化的多種技術為本領域中已知的。

【0263】 取代變異體之一種類型涉及取代親本抗體(例如，人源化或人抗體)的一或多個高度變異區殘基。通常，經選擇用於進一步研究的所得變異體，相較於親本抗體，在某些生物學特性(例如增加的親和力、降低的免疫原性)方面將具有修飾(例如，增進)，及/或將實質上保留該親本抗體的某些生物學特性。例示性取代變異體為親和力成熟的抗體，其可方便地產生，例如，使用基於噬菌體展示的親和力成熟技術，如本文所述者。簡而言之，一或多個 HVR 殘基發生突變，而該變異抗體展示在噬菌體上，並針對特定的生物活性(例如結合親和力)進行篩選。

【0264】 可在 HVR 中進行改變(例如，取代)，以例如增進抗體親和力。此類改變可在 HVR「熱點」中進行，即由在體細胞成熟過程中經歷高頻率突變的密

碼子編碼的殘基(請參見，例如，Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179-196 (2008))，及/或 SDR (a-CDR)，其中所得變異體 VH 或 VL 的結合親和力係經測試。藉由構建及自二級庫中重新篩選而達成親和力成熟，已描述於如 Hoogenboom 等人，Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O' Brien 等人編，Human Press, Totowa, NJ (2001))。在親和力成熟的一些實施例中，在選定用於成熟化的可變基因中引入多樣性，藉由多種方法之任一者達成(例如，易錯 PCR、鏈改組、或寡核苷酸-定向突變)。之後創建二級庫。之後篩選該庫，以辨識出具有希望親和力的任何抗體變異體。另一種引入多樣性的方法涉及 HVR-導向法，其中數個 HVR 殘基(例如，一次 4 至 6 個殘基)被隨機化。參與抗原結合的 HVR 殘基可被特異性辨識出，例如，使用丙胺酸掃描突變或模擬。尤其是 CDR-H3 和 CDR-L3 經常成為標靶。

【0265】 在一些實施例中，取代、插入或刪去可發生在一或多個 HVR 內，只要此類改變實質上不降低抗體結合抗原的能力。例如，可在 HVR 內進行實質上不會降低結合親和力的保守性改變(例如，本文提供的保守性取代)。此類改變可能在 HVR「熱點」或 CDR 之外。在上文提供的變異體 VH 序列的一些實施例中，每一 HVR 未經改變或包含不超過一、二或三個胺基酸取代。

【0266】 一種用於辨識抗體中目標用於突變的殘基或區域的可用方法被稱為「丙胺酸掃描突變」，描述於 Cunningham 和 Wells (1989) Science, 244: 1081-1085。在此方法中，目標殘基之一殘基或殘基組(例如帶電殘基，例如 Arg、Asp、His、Lys 和 Glu)被辨識出，並被中性或帶負電的胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)取代，以決定抗體與抗原的相互作用是否受到影響。其他取代可引入至顯示出對初始取代的功能敏感性的胺基酸位置處。替代地或額外地，抗原-抗體複合物的晶體結構係用於辨識抗體和抗原之間的接觸位點。此類接觸殘基和相鄰殘基可被靶向或消除，而作為取代的候選物。可篩選變異體以確定其是否含有所希望的特性。

【0267】 胺基酸序列的插入包括胺基及/或羧基端融合，長度範圍從一個殘基

到含有一百個或更多個殘基的多肽，以及單一或多個胺基酸殘基的序列內插入。末端插入的實例包括具有 N-端甲硫胺醯殘基的抗體。該抗體分子的其他插入型變異體包括抗體的 N-或 C-端融合至一酵素(例如，針對 ADEPT)或一增加該抗體之血清半衰期的多肽。

b)醣基化變異體

【0268】 在一些實施例中，本文提供的抗體經改變以增加或減少抗體被醣基化的程度。向抗體加入或刪除醣基化位點可方便地藉由改變胺基酸序列，藉此創造或移除一或多個醣基化位點而達成。

【0269】 在抗體包含一 Fc 區時，與其相連的碳水化合物可被改變。哺乳動物細胞產生的天然抗體通常包含分支、雙觸角寡醣，其藉由 N-橋聯連結至 Fc 區之 CH2 域的 Asn297。請參見例如，Wright 等人 TIBTECH 15: 26-32 (1997)。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露醣、N-乙醯葡醣胺(GlcNAc)、半乳醣和唾液酸，以及在雙觸角寡醣結構的「主幹」中連接至 GlcNAc 的岩藻醣。在一些實施例中，本申請案的抗體可進行寡醣修飾，以創造具有某些增進特性的抗體變異體。

【0270】 在一些實施例中，係提供具有醣類結構的抗體變異體，該醣類結構缺乏(直接或間接)連接到 Fc 區的岩藻醣。例如，此類抗體中岩藻醣的含量可為 1 至 80%、1%至 65%、5%至 65%或 20%至 40%。岩藻醣的量是藉由計算 Asn297 醣鏈內的岩藻醣平均含量而決定的，相對於與 Asn 297 相連的所有醣結構(例如，複合、雜合和高度甘露醣結構)的總和，以 MALDI-TOF 質譜法測量，如 WO 2008/077546 中所述。Asn297 是指位於 Fc 區約位置 297 的天冬醯胺殘基(Fc 區殘基的 EU 編號)；然而，由於抗體的微小序列差異，Asn297 也可能位於位置 297 上游或下游約±3 個胺基酸處，即介於位置 294 和 300 之間。此類岩藻醣基化變異體可具有增進的 ADCC 功能。請參見，例如，美國專利公開號 US 2003/0157108 (Presta、L.)；US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo 股份有限公司)。與「去岩藻醣基化」或「岩藻醣缺失」抗體變異體相關的文獻實例包括：

US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki 等人，J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki 等人 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。能夠產生去岩藻醣基化抗體的細胞株實例包括缺乏蛋白質岩藻醣基化的 Lec13 CHO 細胞(Ripka 等人，Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986)；US 專利申請案號 US 2003/0157108 A1，Presta, L；及 WO 2004/056312 A1，Adams 等人)，以及敲除細胞株，例如 α-1、6-岩藻醣基轉移酶基因 FUT8 敲除 CHO 細胞(請參見例如 Yamane-Ohnuki 等人，Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)；Kanda, Y. 等人，Biotechnol. Bioeng., 94 (4):680-688 (2006)；以及 WO2003/085107)。

【0271】 抗體變異體更提供二等分的寡醣，例如，其中連接到抗體 Fc 區的雙觸角寡醣被 GlcNAc 二等分。此類抗體變異體可能具有降低的岩藻醣基化及/或增進的 ADCC 功能。此類抗體變異體的實例描述於例如 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 等人)；美國專利號 6,602,684 (Umana 等人)；以及 US 2005/0123546 (Umana 等人)。亦提供在連接到 Fc 區的寡醣中具有至少一個半乳醣殘基的抗體變異體。此類抗體變異體可具有增進的 CDC 功能。此類抗體變異體描述於例如 WO 1997/30087 (Patel 等人)；WO 1998/58964 (Raju, S.)；以及 WO 1999/22764 (Raju, S.)。

【0272】 CAR (包括其功能部分和功能變異體)可藉由本領域中已知的方法獲得。CAR 可經由任何製備多肽或蛋白質的合適方法製備。自始合成多肽和蛋白質的合適方法描述於參考文獻中，例如 Chan 等人，Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, Reid, R.編，Marcel Dekker, Inc., 2000；Epitope Mapping, Westwood 等人編，Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001；以及

美國專利號 5,449,752。此外，多肽和蛋白質可使用本文所述的核酸使用標準重組方法重組產生。請參見例如 Sambrook 等人，Molecular Cloning：A Laboratory Manual，第 3 版，Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001；以及 Ausubel 等人，Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, N Y, 1994。此外，一些 CAR (包括其功能部分和功能變異體)可從來源，例如植物、細菌、昆蟲、哺乳動物(例如大鼠、人類)等中分離及/或純化出。分離和純化的方法為本領域中已知的。或者，本文所述的 CAR (包括其功能部分和功能變異體)可由工廠工業合成。在此態樣中，CAR 可為合成性、重組性、經分離及/或經純化。

可偵測標記物與標籤

【0273】 CAR、表現 CAR 的 T 細胞、單株抗體、其抗原結合片段，特異於本文揭示的一或多種抗原，亦可與標籤蛋白一起表現(例如，共表現)。在一些實施例中，一弗林蛋白酶識別位點和下游 2A 自裂解胜肽序列，設計用於該標籤序列和 CAR 序列的同時雙順反子表現。在一些實施例中，該 2A 序列包含核酸序列 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 44)。在一些實施例中，弗林蛋白酶和 P2A 序列包含編碼 SEQ ID NO: 44 之胺基酸序列的核酸序列。在一些實施例中，P2A 標籤包含 SEQ ID NO: 44 的胺基酸序列或具有與其至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%一致性的序列。

【0274】 在一些實施例中，特異於本文揭示的一或多種抗原之 CAR、表現 CAR 的 T 細胞、單株抗體、其抗原結合片段，亦可與 EGFR 一起表現。在一些實施例中，特異於本文揭示的一或多種抗原之 CAR、表現 CAR 的 T 細胞、單株抗體、其抗原結合片段，係與截短的 EGFR (tEGFR)一起表現(例如，共表現)。在一些實施例中，tEGFR 包含與 SEQ ID NO: 43 至少 95%一致、至少 96%一致、至少 97%一致、至少 98%一致、至少 99%一致或 100%一致的胺基酸序列。

tEGFR:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIS

GDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAF
ENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTI
NWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCR
NVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCI
QCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCT
GPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM (SEQ ID NO: 43)

【0275】 特異於本文揭示的一或多種抗原之 CAR、表現 CAR 的 T 細胞、單株抗體、其抗原結合片段，亦可與可偵測標記物共軛；例如，能夠藉由 ELISA、分光光度法、流式細胞術、顯微術或診斷成像技術(例如電腦斷層掃描(CT)、電腦軸向斷層掃描(CAT)掃描、磁共振成像(MRI)、核磁共振成像(NMRI)、磁共振斷層掃描(MTR)、超音波、光纖檢查和腹腔鏡檢查)偵測的可偵測標記物。可偵測標記物的具體、非限制性實例包括螢光基團、化學發光劑、酵素聯結、放射性同位素和重金屬或化合物(例如用於以 MRI 偵測的超順磁性氧化鐵奈米晶體)。例如，可使用的可偵測標記物包括螢光化合物，包括螢光素、異硫氰酸螢光素、羅丹明(rhodamine)、5-二甲胺-1-萘磺醯氯、藻紅蛋白、鑭系元素磷光體、及類似物。亦可使用生物發光標記物，例如螢光素酶、綠色螢光蛋白(GFP)、黃色螢光蛋白(YFP)。特異於本文揭示的一或多種抗原之 CAR、表現 CAR 的 T 細胞、抗體、其抗原結合片段，亦可與用於偵測的酵素共軛，例如辣根過氧化酶、β-半乳醣苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶、葡萄醣氧化酶、及類似物。當 CAR、表現 CAR 的 T 細胞、抗體、其抗原結合片段，與可偵測的酵素共軛時，可藉由加入額外的試劑進行偵測，該酵素使用該額外試劑產生可辨別的反應產物。例如，當辣根過氧化酶試劑存在時，加入過氧化氫和二胺基聯苯胺會產生有色反應產物，該產物可目視偵測。CAR、表現 CAR 的 T 細胞、抗體、其抗原結合片段，亦可與生物素共軛，並經由抗生物素蛋白(avidin)或鏈黴抗生物素蛋白(streptavidin)結合的間接測量來偵測。應當注意的是，抗生物素蛋白本身可與酵素或螢光標記共軛。

【0276】 CAR、表現 CAR 的 T 細胞、抗體、其抗原結合片段，可與順磁性

劑例如釓共軛。順磁性試劑如超順磁性氧化鐵亦可作為標記物。抗體亦可與鑭系元素(例如銪和鏑)和錳共軛。抗體或抗原結合片段亦可標記有可被二級報導子辨識的預定多肽表位(例如白胺酸拉鍊對序列、二級抗體的結合位點、金屬結合域、表位標籤)。

【0277】 CAR、表現 CAR 的 T 細胞、抗體、其抗原結合片段，亦可與經放射性標記的胺基酸共軛。放射性標記可用於診斷和治療目的。例如，放射性標記可用於藉由 X 射線、發射光譜或其他診斷技術偵測本文揭示的一或多種抗原及表現抗原的細胞。此外，該放射性標記可在治療上作為毒素，以治療個體的腫瘤，例如治療神經母細胞瘤。多肽之標籤的實例包括但不限於以下放射性同位素或放射性核苷酸：^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I。

【0278】 偵測此類可偵測標記物的方法為本領域技術人員眾所周知的。因此，例如，放射性標記可使用照相底片或閃爍計數器偵測，螢光標記物可使用光偵測器偵測發出的光線而偵測。酵素性標記物通常藉由提供酵素與受質，並偵測酵素對受質作用產生的反應產物，且藉由簡單地觀察有色標記物而偵測該顯色標記物。

核酸、表現載體及宿主細胞

【0279】 本發明之一實施例進一步提供一種核酸，該核酸包含編碼本文所述的任何 CAR、抗體或其抗原結合部分(包括其功能部分和功能變異體)的核苷酸序列。本發明的核酸可包含編碼本文所述的前導序列、抗原結合域、跨膜域及/或細胞內 T 細胞信號傳導域之任一者的核苷酸序列。

【0280】 在一態樣中，本發明涵蓋包含編碼 CAR 的核酸分子的重組核酸構建體，其中該核酸分子包含編碼例如本文所述的抗 GCC 結合域的核酸序列，其相鄰於或位於該編碼細胞內信號域的核酸序列之同一讀框中。可用於 CAR 中之例示性之細胞內信號傳導域包括，但不限於：一或多個細胞內信號傳導域，例如 CD3-ζ、CD28、4-1BB 及類似物。在一些實施例中，該 CAR 可包含 CD3-ζ、CD28、4-IBB 及類似物之任何組合。

【0281】 在一態樣中，本發明提供一種核酸，其包含與編碼本文所述之 CAR 構築體的核酸至少約 70%或更高，如 80%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%或約 99%一致之核苷酸序列。

【0282】 在一些實施例中，該核酸編碼一抗 GCC 結合域，其選自於表 1-3 或表 7 中所提供之抗 GCC VH 序列。在一些實施例中，該核酸包含與 SEQ ID NO: 61-70 之任一者至少約 70%或更高，如 80%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%或約 99%一致之序列。在一些實施例中，該核酸包含與 SEQ ID NO: 61-70 之任一者一致之序列。

【0283】 在一些實施例中，該核苷酸序列可經密碼子修飾。不受特定理論的束縛，一般相信該核苷酸序列的密碼子最佳化可增加 mRNA 轉錄物的轉譯效率。該核苷酸序列的密碼子最佳化可能涉及以天然密碼子取代另一個編碼相同胺基酸的密碼子，但可藉由細胞內更容易獲得的 tRNA 轉譯，因而提高轉譯效率。該核苷酸序列的最佳化亦可降低會干擾轉譯的二級 mRNA 結構，因而提高轉譯效率。

【0284】 在本發明之一實施例中，該核酸可包含編碼本發明 CAR 之抗原結合域的密碼子-經修飾之核苷酸序列。在本發明之另一實施例中，該核酸可包含編碼本發明 CAR 之任一者(包括功能部分及其功能變異體)之密碼子-經修飾之核苷酸序列。

【0285】 在一態樣中，本發明涉及一載體，其包含本文所述的核酸分子，例如編碼本文所述的 CAR 的核酸分子。在一實施例中，該載體選自於由以下組成之組：DNA、RNA、質體、慢病毒載體、腺病毒載體或逆轉錄病毒載體。

【0286】 在一實施例中，該載體為慢病毒載體。在一實施例中，該載體進一步包含一啟動子。在一實施例中，該啟動子為 EF-1 啟動子。

【0287】 表現載體包括質體、逆轉錄病毒、黏接質體、YAC、EBV 衍生的附加體、及類似物。一種方便的載體為編碼功能完整人類 CH 或 CL 免疫球蛋白序列的載體，其具有經改造的適當限制性位點，以便可以輕鬆插入和表現任何

VH 或 VL 序列。在此種載體中，剪接通常發生在插入 J 區的剪接供體位點和人類 C 區之前的剪接受體位點之間，也發生在人類 CH 外顯子內的剪接區。合適的表現載體可包含許多組件，例如複製起點、可選擇標記基因、一或多種表現控制元件，例如轉錄控制元件(例如啟動子、增強子或終止子)、及/或一或多個轉譯信號、一信號序列或前導序列、及類似物。聚腺苷酸化和轉錄終止發生在該編碼區下游的天然染色體位點。所得嵌合性抗體可與任何強啟動子連接。可使用的合適載體實例包括適用於哺乳動物宿主並以病毒複製系統為基礎者，例如猿猴病毒 40(SV40)、勞斯肉瘤病毒(RSV)、腺病毒 2、牛乳頭狀瘤病毒(BPV)、乳多泡病毒 BK 突變異體(BKV)，或小鼠和人類巨細胞病毒(CMV)，以及莫洛尼氏鼠白血病病毒(MMLV)、天然 Ig 啟動子等。多種合適的載體為本領域中已知的，包括維持在單副本或多副本、或整合到宿主細胞染色體中的載體，例如，經由 LTR，或經改造而具有多個整合位點的人工染色體(Lindenbaum 等人，*Nucleic Acids Res.* 32:e172 (2004)、Kennard 等人，*Biotechnol. Bioeng*. Online May 20, 2009)。合適載體的額外實例在後面章節中列出。

【0288】　本發明亦包括可直接轉染到細胞中的 RNA 構建體。一種產生用於轉染的 mRNA 的方法，涉及以特別設計的引子對模板進行體外轉錄(IVT)，之後進行 polyA 加入步驟，以產生含有 3'和 5'未轉譯序列(「UTR」)、5'帽及/或內部核醣體進入位點(IRES)、待表現的核酸和 polyA 尾部，長度通常為 50 至 2000 個鹼基。如此產生的 RNA 可有效地轉染不同種類的細胞。在一實施例中，該模板包括用於該 CAR 之序列。在一實施例中，藉由電穿孔將 RNA CAR 載體轉導至細胞例如 T 細胞或 NK 細胞中。

【0289】　因此，本發明提供一種包含一核酸的表現載體，該核酸編碼一抗體、抗體的抗原結合片段(例如，人類、人源化、嵌合抗體或任何前述的抗原結合片段)、抗體鏈的核酸(例如，重鏈、輕鏈)或結合至 GCC 蛋白的抗體鏈的抗原結合部分。

【0290】　在真核宿主細胞中的表現是有用的，因為此類細胞比原核細胞更有

可能組裝和分泌出正確折疊的和具有免疫學活性的抗體。然而，任何所得由於不正確折疊而失活之抗體，可根據已知方法重新恢復活性(Kim 及 Baldwin、"Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51、第 459-89 頁(1982))。宿主細胞可能會產生完整抗體的一部分，例如輕鏈二聚體或重鏈二聚體，其亦為本發明的抗體類似物。

【0291】 在一實施例中，可將核酸加入重組表現載體中。在此方面，一實施例提供包含該核酸任一者的重組表現載體。出於本文目的，術語「重組表現載體」是指基因經修飾的寡核苷酸或聚核苷酸構建體，當該構建體包含編碼該 mRNA、蛋白質、多肽或胜肽的核苷酸序列時，其允許宿主細胞表現該 mRNA、蛋白質、多肽或胜肽，且該載體在足以在細胞內表現該 mRNA、蛋白質、多肽或胜肽的條件下與該細胞接觸。這些載體並非以一個整體天然發生。

【0292】 然而，該載體之一部分可為天然發生。重組表現載體可包含任一類型的核苷酸，包括但不限於 DNA 和 RNA，其可為單鏈或雙鏈、合成或部分來自天然來源，且可包含天然的、非天然的或經改變的核苷酸。該重組表現載體可包含天然發生或非天然發生的核苷酸間聯結，或兩種類型的聯結兼具。較佳地，非天然發生或經改變的核苷酸或核苷酸間聯結並不阻礙載體的轉錄或複製。

【0293】 在一實施例中，該重組表現載體可為任何合適的重組表現載體，且可用於轉型或轉染任何合適的宿主細胞。合適的載體包括設計用於繁殖和擴增或用於表現、或兩者兼有的載體，例如質體和病毒。該載體可選自於由下組成之組：pUC 系列(Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Md.)、pBluescript 系列(Stratagene, LaJolla, CA)、pET 系列(Novagen, Madison, WI)、pGEX 系列(Pharmacia Biotech，Uppsala，Sweden)和 pEX 系列(Clontech，Palo Alto，CA)。

【0294】 亦可使用噬菌體載體，例如 λ、λZapII (Stratagene)、EMBL4 和 λNMI 149。植物表現載體的實例包括 pBIO1、pBI101.2、pBHO1.3、pBI121 和 pBIN19(Clontech)。動物表現載體的實例包括 pEUK-C1、pMAM 和 pMAMneo

(Clontech)。重組表現載體可為病毒載體，例如逆轉錄病毒載體或慢病毒載體。慢病毒載體是衍生自慢病毒基因組的至少一部分的載體，尤其包括自失活慢病毒載體，如提供於 Milone 等人，Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)。可用於臨床的慢病毒載體的其他實例包括，例如但不限於，來自 Oxford BioMedica plc 的 LENTIVECTOR®基因遞送技術、來自 Lentigen 的 LENTIMAX™載體系統、及類似技術。非臨床類型的慢病毒載體亦可獲得，且為本領域技術人員已知。

【0295】 許多轉染技術為本領域中已知的(請參見，例如 Graham 等人，Virology, 52: 456-467 (1973)；如前述之 Sambrook 等人；Davis 等人，Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986)；以及 Chu 等人，Gene, 13: 97 (1981))。

【0296】 轉染方法包括磷酸鈣共沉澱(請參見例如如前述之 Graham 等人)、直接微量注射到培養細胞中(請參見例如 Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980))、電穿孔(請參見例如，Shigekawa 等人，BioTechniques, 6: 742-751 (1988))、微脂體介導的基因轉移(請參見例如，Mannino 等人，BioTechniques, 6: 682-690 (1988))、脂質介導的轉導(請參見例如，Feigner等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987))、和使用高速微彈的核酸遞送(請參見例如，Klein 等人，Nature, 327: 70-73 (1987))。

【0297】 在一實施例中，重組表現載體可使用(例如)如前述之 Sambrook 等人及如前述之 Ausubel 等人所描述之標準重組 DNA 技術製備。可製備環狀或直線表現載體的構建體，以包含在原核或真核宿主細胞中發揮作用的複製系統。複製系統可衍生自例如 ColE1、2μ 質體、λ、SV40、牛乳突狀瘤病毒、及類似病毒。

【0298】 重組表現載體可包含調控序列，例如轉錄和轉譯起始和終止密碼子，其特異於待引入該載體的宿主細胞類型(例如細菌、真菌、植物或動物)，若合適的話，並考慮該載體是基於 DNA 還是基於 RNA。該重組表現載體可包含限制性位點，以幫助選殖。

【0299】 重組表現載體可包括一或多種標記基因，其允許篩選出經轉型或經轉染的宿主細胞。標記基因包括殺生物劑抗性，例如對抗生素、重金屬等的抗性，在營養缺陷型宿主中的互補，以提供原養型及類似物。適用於本發明表現載體的標記基因包括，例如，新黴素/G418 抗性基因、潮黴素抗性基因、組胺醇抗性基因、四環素抗性基因、和胺苄青黴素抗性基因。

【0300】 該重組表現載體可包含天然或非天然啟動子，其可操作地連接至編碼該 CAR (包括功能部分及其功能變異體)的核苷酸序列、或與編碼該 CAR 的核苷酸序列互補或雜合的核苷酸序列。啟動子的選擇，例如強、弱、可誘導、組織特異性和發育特異性，係落於技術人員的一般技能範圍內。類似地，核苷酸序列與啟動子的組合也落於技術人員的一般技能範圍內。該啟動子可為非病毒啟動子或病毒啟動子，例如巨細胞病毒(CMV)啟動子、SV40 啟動子、RSV 啟動子、EF1 α 啟動子或在鼠幹細胞病毒的長末端重複序列中發現的啟動子。

【0301】 重組表現載體可設計為用於暫時表現、穩定表現或兩者皆是。此外，重組表現載體可製備為用於組成型表現或誘導型表現。

【0302】 此外，重組表現載體可製備為包括一自殺基因。如本文所用，術語「自殺基因」是指導致表現該自殺基因的細胞死亡的基因。自殺基因可為賦予表現基因的細胞對試劑(例如藥物)的敏感性，並在細胞與試劑接觸或暴露於試劑時導致細胞死亡的基因。自殺基因為本領域中已知的(請參見，例如，Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004)，包括例如單純皰疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶去胺基酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基還原酶。

【0303】 一實施例進一步提供包含本文所述的任何重組表現載體的宿主細胞。如本文所用，術語「宿主細胞」是指可含有本發明的重組表現載體的任一類型細胞。該宿主細胞可為真核細胞，例如植物、動物、真菌或藻類，或可為原核細胞，例如細菌或原生動物。該宿主細胞可為培養細胞或初代細胞，即直接從

生物體例如人類分離出。該宿主細胞可為附著細胞或懸浮細胞(即懸浮生長的細胞)。合適的宿主細胞為本領域中已知的，包括例如 DH5a 大腸桿菌細胞、中國倉鼠卵巢細胞、猴 VERO 細胞、COS 細胞、HEK293 細胞、HEK293T 細胞、及類似細胞。為了擴增或複製該重組表現載體目的，該宿主細胞可為原核細胞，例如 DH5a 細胞。為了產生重組 CAR 之目的，該宿主細胞可為哺乳動物細胞。該宿主細胞可為人類細胞。當宿主細胞可為任何細胞類型、可衍生自任何類型的組織且可處於任何發育階段時，該宿主細胞可為周邊血液淋巴細胞(PBL)或周邊血液單核細胞(PBMC)。該宿主細胞可為 T 細胞。

【0304】　出於本文之目的，該 T 細胞可為任何 T 細胞，諸如經培養 T 細胞，例如初代 T 細胞，或來自經培養 T 細胞株，例如 Jurkat、SupTl 等的 T 細胞，或自哺乳動物獲得之 T 細胞。若自哺乳動物獲得，則該 T 細胞可自多種來源獲得，包括但不限於血液、骨髓、淋巴結、胸腺或其他組織或液體。T 細胞亦可經富集或純化。該 T 細胞可為人類細胞。該 T 細胞可為分離自人類之 T 細胞。該 T 細胞可為任何類型之 T 細胞且可為任何發育階段，包括但不限於：CD4+/CD8+ 雙陽性 T 細胞、CD4+輔助 T 細胞(例如 Th1 及 Th2 細胞)、CD8+ T 細胞(例如，細胞毒殺 T 細胞)、腫瘤浸潤細胞、記憶 T 細胞、記憶幹細胞(即 Tscm)、原始 T 細胞及類似細胞。該 T 細胞可為 CD8+ T 細胞或 CD4+ T 細胞。

【0305】　於一實施例中，如本文所述的 CAR 可用於合適的非 T 細胞中。此類細胞為具有免疫效應功能者，例如由多潛能幹細胞產生之 NK 細胞及 T-類似細胞。

【0306】　本申請案之一態樣係提供一種經改造之免疫效應細胞，其包含本文所述的 CAR 之任一者，或上述任何一種經分離的核酸，或上述任何一種載體。在一些實施例中，該免疫效應細胞為 T 細胞、NK 細胞、周邊血液單核細胞(PBMC)、造血幹細胞、多潛能幹細胞或胚胎幹細胞。在一些實施例中，該免疫效應細胞為 T 細胞。

【0307】　一實施例亦提供包含至少一種本文所述之宿主細胞的細胞群。該細

胞群可為異質群，其包含含有所述的任何重組表現載體的宿主細胞，以及至少一種其他細胞(例如不包含任何該重組表現載體的宿主細胞(如 T 細胞))、或 T 細胞以外的細胞，例如 B 細胞、巨噬細胞、中性顆粒細胞、紅血球、肝細胞、內皮細胞、上皮細胞、肌肉細胞、腦細胞等。或者，該細胞群可為實質上同質之群體，其中該群體主要包含含有該重組表現載體(例如基本上由其組成)的宿主細胞。該群體亦可為細胞的複製群體，其中該群體的所有細胞皆為包含一重組表現載體的單一宿主細胞的複製株，而使得該群體的所有細胞都包含該重組表現載體。在本發明之一實施例中，該細胞群為包含宿主細胞的複製株群，該宿主細胞包含如本文所述的重組表現載體。

【0308】 CAR (包括其功能部分及其變異體)、核酸、重組表現載體、宿主細胞(包括其群體)及抗體(包括其抗原結合部分)，可經分離及/或純化。例如，經純化(或經分離)的宿主細胞製備物，係為其中宿主細胞比其體內自然環境中的細胞更純。此類宿主細胞可例如藉由標準純化技術製造。在一些實施例中，宿主細胞之製備物經純化，使得宿主細胞含量為該製備物之總細胞含量的至少約 50%，例如至少約 70%。例如，該純度可為至少約 50%、可大於約 60%、約 70%或約 80%、或可為約 100%。

【0309】 編碼所希望分子的核酸序列可使用本領域中已知的重組方法獲得，例如藉由篩選來自表現該基因的細胞之基因庫、藉由從已知包括相同基因的載體中衍生出基因、或藉由使用標準技術直接從含有它們的細胞和組織中分離出。

【0310】 或者，感興趣的基因可合成產生，而非複製。本發明亦提供插入本發明 DNA 的載體。衍生自逆轉錄病毒(如慢病毒)的載體為達成長期基因轉移的合適工具，因為它們允許轉基因長期穩定整合並在子代細胞中繁殖。慢病毒載體比衍生自癌-逆轉錄病毒(例如鼠類白血病病毒)的載體具有額外的優勢，因為它們可以轉導非增殖細胞(例如肝細胞)。它們亦具有低免疫原性的額外優勢。

【0311】 編碼 CAR 的天然或合成核酸的表現，可藉由將編碼 CAR 多肽或其部分的核酸可操作地連接至一啟動子，並將該構建體整合到表現載體中而達成。

該載體可適用於複製和整合至真核生物中。典型的複製載體包含轉錄和轉譯終止子、起始序列和用於調控所希望核酸序列表現的啟動子。

【0312】 本發明的表現構建體亦可用於核酸免疫化和基因治療，使用標準基因遞送流程。基因遞送的方法為本領域中已知的。請參見例如，美國專利號5,399,346、5,580,859、5,589,466，其係以全文引用之方式併入本文中。在另一實施例中，本發明提供一種基因治療載體。

【0313】 可將核酸選殖至多種類型的載體中。例如，可將該核酸選殖到以下載體中，包括但不限於：質體、噬菌體、噬菌體衍生物、動物病毒和黏接質體。特別感興趣的載體包括表現載體、複製載體、探針產生載體和定序載體。此外，該表現載體可以病毒載體形式提供至細胞中。

【0314】 病毒載體技術為本領域中已知的，並描述於例如 Sambrook 等人(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)，以及其他病毒學和分子生物學手冊。可作為載體的病毒包括但不限於：逆轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、皰疹病毒和慢病毒。一般而言，合適的載體包含在至少一種生物體中有功能的複製起點、一啟動子序列、方便的限制性內切核酸酶位點、和一或多種可篩選標記物(例如，WO 01/96584；WO 01/29058；和美國專利號 6,326,193)。

【0315】 目前已開發多種基於病毒的系統，用於將基因轉移到哺乳動物細胞中。例如，逆轉錄病毒為基因傳遞系統提供一個方便的平台。可使用本領域已知的技術將選定的基因插入載體，並包裝在逆轉錄病毒顆粒中。之後可分離出該重組病毒，並將其經體內或離體遞送至個體的細胞中。許多逆轉錄病毒系統為本領域中已知的。在一些實施例中，使用腺病毒載體。有多種腺病毒載體為本領域中已知的。在一實施例中，使用慢病毒載體。

【0316】 額外的啟動子元件，例如增強子，係調控轉錄啟動的頻率。通常，它們位於起始位點上游 30-110 bp 的區域，儘管最近證實有許多啟動子亦包含位於起始位點下游的功能元件。啟動子元件之間的間距通常是可調整的，因此當

元件相互倒置或移動時，啟動子功能得以保留。在胸苷激酶(tk)啟動子中，在活性開始下降之前，啟動子元件之間的間距可增加到 50 bp。取決於啟動子，單獨元件可協同或獨立地發揮功能以活化轉錄作用。

【0317】 合適的啟動子之一實例為即刻早期巨細胞病毒(CMV)啟動子序列。此啟動子序列為強組成型啟動子序列，能夠驅動與其可操作地連接的任一聚核甘酸序列的高位準表現。

【0318】 合適的啟動子之另一實例為延長生長因子-l a (EF-la)。然而，亦可使用其他組成型啟動子序列，包括但不限於：猿猴病毒 40 (SV40)早期啟動子、小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)、人類免疫缺陷病毒(HIV)長末端重複(LTR)啟動子、MoMuLV 啟動子、禽類白血病病毒啟動子、愛潑斯坦-巴爾(Epstein-Barr)病毒立即早期啟動子、勞斯(Rous)肉瘤病毒啟動子，以及人類基因啟動子，例如但不限於：肌動蛋白啟動子、肌凝蛋白啟動子、血紅蛋白啟動子和肌酸激酶啟動子。此外，本發明不應限於使用組成型啟動子。誘導型啟動子亦被考慮作為本發明的一部分。誘導型啟動子的使用提供一種分子開關，當需要此種表現時，它能夠開啟與其可操作連接的聚核甘酸序列的表現，或者在不需要表現時關閉該表現。誘導型啟動子的實例包括但不限於：金屬硫胺酸啟動子、醣皮質激素啟動子、孕酮啟動子和四環素啟動子。

【0319】 為了評估 CAR 多肽或其部分的表現，待引入細胞中的表現載體亦可包含一可篩選標記基因或報導子基因或兩者皆有，以幫助從應經病毒載體轉染或感染之細胞群中辨識和篩選出該表現細胞。在其他態樣中，該可篩選標記物可攜帶在分隔的 DNA 片段上，並用於共轉染程序中。

【0320】 可篩選標記和報導子基因都可側接合適的調控序列，以使其能夠在宿主細胞中表現。可使用的可篩選標記物包括例如抗生素抗性基因，例如 neo 及類似基因。報導子基因用於辨識潛在的轉染細胞和評估調控序列的功能性。一般而言，報導子基因並不存在於接受者生物體或組織中，或不由接受者生物體或組織表現，且編碼其表現可經一些易於偵測的特性例如酵素活性來證明之

多肽。在將DNA引入接受者細胞後，在合適的時間測定報導子基因的表現。合適的報導子基因可包括編碼螢光素酶、β-半乳醣苷酶、氯黴素乙醯轉移酶、分泌性鹼性磷酸酶或綠色螢光蛋白基因的基因(例如，Ui-Tei 等人，2000 FEBS Letters 479: 79-82)。適合之表現系統為已知，且可使用已知技術或經商業上獲得而製備。一般而言，具有最小 5'側翼區域並顯示出最高報導子基因表現位準的構建體，被辨識為啟動子。此類啟動子區域可與報導子基因連接，並用於評估試劑調控啟動子驅動轉錄的能力。

【0321】 將基因引入細胞和表現的方法為本領域中已知的。在表現載體的情況下，係藉由本領域已知的任何方法將該載體輕易地引入宿主細胞中，例如哺乳動物、細菌、酵母或昆蟲細胞。例如，可藉由物理、化學或生物方法將該表現載體轉移到宿主細胞中。將聚核苷酸引入宿主細胞的物理方法包括磷酸鈣沉澱、脂質轉染、粒子轟擊、顯微注射、電穿孔及類似方法。生產包含載體及/或外源核酸之細胞的方法為本領域中已知的。請參見例如 Sambrook 等人 (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。將聚核苷酸引入宿主細胞之一較佳方法為磷酸鈣轉染。

【0322】 將感興趣的聚核苷酸引入宿主細胞的生物學方法包括使用 DNA 和 RNA 載體。病毒載體，尤其是逆轉錄病毒載體，已成為將基因插入哺乳動物(例如人類細胞)最廣泛使用的方法。其他病毒載體可衍生自慢病毒、痘病毒、單純皰疹病毒 I、腺病毒和腺相關病毒及類似病毒。請參見，例如，美國專利號 5,350,674 和 5,585,362。 將聚核苷酸引入宿主細胞的化學方法包括膠體分散系統，例如大分子複合物、奈米膠囊、微球、微珠、和基於脂質的系統，包括水包油乳液、微胞、混合微胞和微脂體。

【0323】 使用作為體外和體內遞送載體的例示性膠體系統為微脂體(例如，人工脂質媒劑)。在使用非病毒遞送系統的情況下，例示性遞送媒劑為奈米顆粒，例如微脂體或其他合適的次微米尺寸遞送系統。考慮使用脂質配方將核酸引入宿主細胞中(體外、離體或體內)。在另一態樣中，核酸可與脂質結合。與脂質

結合的核酸可被包裹在微脂體的水性內部，散佈在微脂體的脂質雙層內，通過同時與微脂體和寡核苷酸二者結合的連接分子連結到微脂體，包裹在微脂體中，與微脂體複合，分散在含有脂質的溶液中，與脂質混合，與脂質結合，作為懸浮液包含在脂質中，包含或與微胞複合，或以其他方式與脂質結合。脂質、脂質/DNA、或脂質/表現載體結合組成物不限於溶液中的任何特定結構。例如，它們可能以雙層結構、微胞或「坍塌」結構存在。它們也可能簡單地散佈在溶液中，可能形成大小或形狀不均勻的聚集體。脂質為脂肪物質，可以是天然發生或合成的脂質。例如，脂質包括天然存在於細胞質中的脂肪滴，以及含有長鏈脂肪烴及其衍生物的化合物類別，例如脂肪酸、醇、胺、胺基醇和醛。

【0324】　適用的脂質可得自商業來源。例如，二肉荳蔻基磷脂醯膽鹼(「DMPC」)可得自 Sigma、St. Louis, MO；磷酸二十六酯(「DCP」)可得自 K & K Laboratories (Plainview、NY)；膽固醇(「Choi」)可得自 Calbiochem-Behring；二肉荳蔻基磷脂醯甘油(「DMPG」)和其他脂質可得自 Avanti Polar Lipids 公司(Birmingham, AL)。脂類在氯仿或氯仿/甲醇中的儲存液可在約-20°C 下儲存。氯仿被用作唯一的溶劑，因為它比甲醇更容易揮發。「微脂體」為通用術語，包括藉由產生封閉的脂質雙層或聚集體而形成的各種單層和多層脂質媒劑。微脂體的特徵在於具有囊泡結構，該結構具有磷脂雙層膜和內部水性介質。多層微脂體具有由水性介質隔開的多脂質層。當磷脂懸浮在過量的水溶液中時，多脂質層會自發形成。脂質成分在形成封閉結構之前會先進行自我重排，並在脂質雙層之間捕捉水和溶解的溶質(Ghosh 等人，1991 Glycobiology 5: 505-10)。

【0325】　然而，亦考量在溶液中具有與正常囊泡結構不同的組成物。例如，脂質可能假設是微胞結構或僅作為脂質分子的不均勻聚集體存在。亦考量 lipofectamine-核酸複合物。無論用於將外源核酸引入宿主細胞或以其他方式將細胞暴露於本發明抑制劑的方法如何，為了確認宿主細胞中重組 DNA 序列的存在，可進行多種測定法。此類測定法包括例如本領域技術人員熟知的「分子生物學」測定法，例如南方和北方印跡、RT-PCR 和 PCR；「生化」測定法，例

如偵測特定胜肽的存在或不存在，例如藉由免疫學方法(ELISA 和西方印跡)或藉由本文所述的測定法，來辨識出落入本發明範圍內的試劑。

【0326】 本發明進一步提供一種載體，其包含編碼 CAR 之核酸分子。在一態樣中，CAR 載體可直接轉導至細胞，例如 T 細胞中。在一態樣中，該載體為選殖或表現載體，例如包括但不限於一或多種質體(例如，表現質體、選殖載體、微環、微載體、雙微染色體)、逆轉錄病毒和慢病毒載體構建體的載體。在一態樣中，該載體能在哺乳動物 T 細胞中表現該 CAR 構建體。在一態樣中，該哺乳動物 T 細胞為人類 T 細胞。

【0327】 在一些態樣中，非病毒方法可用於將編碼本文所述的 CAR 的核酸遞送至細胞或組織或個體中。在一些實施例中，該非病毒方法包括使用轉座子(也稱為轉位元)。在一些實施例中，轉座子為一段可將自身插入基因組中某個位置的 DNA，例如，一段能夠自我複製並將其副本插入基因組的 DNA，或一段可從更長的核酸中剪出並插入基因組中的另一位置的 DNA。

【0328】 額外的和例示性轉座子和非病毒遞送方法係描述於 2016 年 4 月 8 日申請的國際申請案 WO 2016/164731 的第 196-198 頁，其係以全文引用之方式併入本文中。

T 細胞來源

【0329】 在擴增及基因修飾(例如，以表現本文所述之 CAR)之前，可自一個體獲得細胞來源，例如 T 細胞或 NK 細胞。術語「個體」係包括可引發免疫反應之活體生物體(例如哺乳動物)。個體之實例包括人類、犬、貓、小鼠、大鼠及其基因轉殖物種。

【0330】 在實施例中，免疫效應細胞(例如免疫效應細胞群體)，例如 T 細胞，係衍生自(例如分化自)幹細胞，例如胚胎幹細胞或多潛能幹細胞，例如誘導多潛能幹細胞(iPSC)。在實施例中，細胞為自體性或同種異體性。在細胞是同種異體的實施例中，該例如衍生自幹細胞(例如，iPSC)之細胞係經修飾以降低同種異體反應。例如，該細胞可經修飾以例如藉由修飾(例如破壞)其 T 細胞受體

來減少其同種異體反應。在實施例中，具位置特異性之核酸酶可用於破壞 T 細胞受體，例如，在 T 細胞分化之後。在其他實例中，例如衍生自 iPSC 之 T 細胞的細胞係可由病毒特異性 T 細胞生成，其由於可辨識出病原體衍生的抗原而不太可能引起移植物-抗-宿主疾病。又在其它實例中，同種異體反應可例如藉由從常見 HLA 單倍型生成 iPSC 而降低(例如降至最低)，使得它們與匹配之無關接受者個體之組織相容。

【0331】 又在其它實例中，同種異體反應可例如藉由通過基因修飾來抑制 HLA 表現而降低(例如降至最低)。例如，衍生自 iPSC 的 T 細胞可如 Themeli 等人 Nat. Biotechnol. 31.10(2013):928-35 所述來處理，其經由引用併入本文中。在一些實例中，衍生自幹細胞的免疫效應細胞(例如 T 細胞)可使用 WO2014/165707(其經由引用併入本文)描述的方法處理/生成。

【0332】 T 細胞可自許多來源獲得，包括周邊血液單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染部位的組織、腹水、肋膜積液、脾臟組織及腫瘤。在本發明的某些態樣中，可使用本領域中任何數目的 T 細胞株。在本發明的某些態樣中，T 細胞可使用熟習此項技術者已知的任何數目的技術(諸如 Ficoll™分離)而自個體收集的血液單元獲得。在一較佳態樣中，來自個體之循環血液的細胞藉由分離術獲得。分離術產物通常包含淋巴細胞，包括 T 細胞、單核細胞、顆粒細胞、B 細胞、其他有核白血球、紅血球和血小板。在一態樣中，藉由分離術收集之細胞可經洗滌，以移除血漿分液，並將細胞置於適當緩衝液或培養基中，以用於後續處理步驟。在本發明的一態樣中，細胞係以磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)洗滌。在另一態樣中，清洗液不含鈣且可不含鎂，或不含許多二價陽離子(若非全部不含)。

【0333】 缺乏鈣的初始活化步驟可能導致活化放大。正如本領域普通技術人員將容易理解的，洗滌步驟可藉由本領域技術人員已知的方法來完成，例如藉由使用半自動「流通」離心機(例如，Cobe 2991 細胞處理器、Baxter CytoMate 或 Haemonetics Cell Saver 5)，根據製造商的說明使用。在洗滌之後，細胞可再

懸浮於各種生物相容緩衝液中，諸如(例如)不含鈣、不含 Mg 之 PBS、PlasmaLyte A、或其他含或不含緩衝液之生理食鹽水溶液中。或者，可移除分離術樣本中的不希望成分，且細胞可直接重新懸浮於培養基中。

【0334】 應認知到，本申請案之方法可利用包含 5%或更少例如 2%的人類 AB 血清的培養基條件，並利用已知的培養基條件和組成物，例如描述於 Smith 等人，“Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement” Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31。

【0335】 在一態樣中，T 細胞自周邊血液淋巴球分離出，藉由裂解紅血球且耗盡單核球，例如藉由經由 PERCOLL™梯度離心，或藉由逆流離心淘析。T 細胞之特定亞群，諸如 CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+及 CD45RO+T 細胞，可藉由陽性或負向篩選技術進一步分離。舉例而言，在一態樣中，T 細胞藉由與抗-CD3/抗-CD28 (例如，3x28)共軛微珠(諸如 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T)一同靜置一段足以正向篩選出所需 T 細胞的時間而分離出。在一態樣中，該時間段為約 30 分鐘。在另一態樣中，該時間段範圍 30 分鐘至 36 小時或更長，且介於其間之所有整數值。在另一態樣中，該時間段為至少 1、2、3、4、5 或 6 小時。在又一較佳態樣中，時間段為 10 至 24 小時。在一態樣中，該靜置時間段為 24 小時。相較於其他細胞類型，更長的培養時間可用於在只有少量 T 細胞的任何情況下分離 T 細胞，例如自腫瘤組織或免疫受損個體中分離出腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)。此外，使用更長的培養時間可增加 CD8+ T 細胞的捕捉效率。因此，藉由簡單地縮短或延長時間，T 細胞被允許結合至 CD3/CD28 微珠，及/或藉由增加或降低微珠與 T 細胞之比率(如本文進一步描述)，在培養起始或製程期間之其他時間點，T 細胞亞群可優先被選擇或對抗。另外，藉由增加或降低微珠或其他表面上的抗-CD3 及/或抗-CD28 抗體之比率，在培養起始或其他希望之時間點，T 細胞亞群可優先被選擇或對抗 熟習此項技術者應瞭解，亦可在本發明之內文中使用多個篩選回合。在某些態樣中，可能

需要執行篩選程序並在活化及擴增製程中使用「未經篩選」的細胞。「未經篩選」的細胞亦可進行進一步篩選回合。

【0336】 藉由負向篩選來富集 T 細胞群體係可藉由引導至負向篩選細胞所特有之表面標記物的抗體組合來實現。其中一種方法為細胞分選及/或篩選，其經由負磁免疫黏附或流式細胞儀進行篩選，其係使用引導至負向篩選細胞所特有之表面標記物的單株抗體混合液。舉例而言，為了藉由負向篩選來富集 CD4+細胞，單株抗體混合液通常包括 CD14、CD20、CDIIb、CD16、HLA-DR 及 CD8 之抗體。在某些態樣中，希望可富集或正向篩選出典型表現 CD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+和 FoxP3+之調節 T 細胞。

【0337】 或者，在某些態樣中，T 調節細胞由抗-C25 共軛微珠或其他類似選擇方法耗盡。本文所描述之方法可包括例如篩選特異性免疫效應細胞亞群，例如 T 細胞，其為 T 調節細胞-耗盡之群體、CD25+耗盡細胞，使用例如本文所描述之負向篩選技術。較佳地，T 調節耗盡細胞群體含有少於 30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的 CD25+細胞。

【0338】 在一實施例中，T 調節細胞(例如 CD25+ T 細胞)係自使用抗-CD25 抗體或其片段或 CD25-結合配位體 IL-2 之群體移出。在一實施例中，該抗-CD25 抗體或其片段或 CD25-結合配位體與基材(例如，微珠)共軛，或以其他方式塗覆於基材(例如微珠)上。在一實施例中，抗-CD25 抗體或其片段與如本文所描述之基材共軛。

【0339】 於一實施例中，該 T 調節細胞(例如 CD25+ T 細胞)係使用 Miltenyi™之 CD25 耗盡試劑自群體移出。在一實施例中，細胞與 CD25 耗盡試劑之比率為 1e7 個細胞對 20 uL、或 1e7 個細胞對 15 uL、或 1e7 個細胞對 10 uL、或 1e7 個細胞對 5 uL、或 1e7 個細胞對 2.5 uL、或 1e7 個細胞對 1.25 uL。在一實施例中，例如針對 T 調節細胞，例如使用超過每毫升 5 億個細胞之 CD25+耗盡。在另一態樣中，使用每毫升 6 億、7 億、8 億或 9 億個細胞之細胞濃度。於一實施例中，待耗盡的免疫效應細胞群包括約 6 x 10^9 個 CD25+T 細胞。在其他態樣中，待耗

盡的免疫效應細胞群包括約 1 x 10^9 至 1 x 10^{10} 個 CD25+ T 細胞，及介於其之間的任何整數值。在一實施例中，所得 T 調節耗竭細胞群具有 2 x 10^9 個 T 調節細胞，例如 CD25+細胞，或更低(例如，1 x 10^9、5 x 10^8、1 x 10^8、5 x 10^7、1 x 10^7 或更少之 CD25+細胞)。

【0340】 在一實施例中，該 T 調節細胞(例如 CD25+細胞)係使用具有耗盡管組的 CliniMAC 系統(如，管路 162-01)從群體移出。在一實施例中，該 CliniMAC 系統是在諸如 DEPLETION2.1 之耗盡設定下運行。

【0341】 在不希望受特定理論束縛之情況下，在個體進行血球分離術之前或製造表現 CAR 的細胞產物期間減少免疫細胞之負向調節因子濃度(例如，減少不想要的免疫細胞數量，例如 TREG 細胞)，可降低個體復發的風險。舉例而言，耗盡 TREG 細胞之方法為本領域中已知的。降低 TREG 細胞之方法包括但不限於環磷醯胺、抗 GITR 抗體(本文所描述之抗 GITR 抗體)、CD25-耗盡及其組合。

【0342】 在一些實施例中，該製造方法包含在製造表現 CAR 的細胞之前減少(例如，耗盡)TREG 細胞的數量。舉例而言，該製造方法包含使樣本(例如分離術之樣本)與抗 GITR 抗體及/或抗-CD25 抗體(或其片段，或 CD25-結合配位體)接觸，以在例如製造表現 CAR 的細胞(例如 T 細胞、NK 細胞)之前耗盡 TREG 細胞。

【0343】 在一實施例中，在收集用於製造表現 CAR 的細胞產物的細胞之前，個體係使用可降低 TRIG 細胞的一或多種療法預先治療，藉此降低個體復發風險至以表現 CAR 的細胞治療。在一實施例中，減少 TREG 細胞之方法包括，但不限於，向個體投予環磷醯胺、抗 GITR 抗體、CD25-耗盡或其組合中之一或多者。投與環磷醯胺、抗 GITR 抗體、CD25-耗盡或其組合中之一或多者，可在輸注表現 CAR 的細胞產物之前、期間或之後進行。

【0344】 在一實施例中，在收集用於製造表現 CAR 的細胞產物的細胞之前，個體係以環磷醯胺進行預處理，藉此降低個體復發風險至以表現 CAR 的細胞治療。在一實施例中，在收集用於製造表現 CAR 的細胞產物的細胞之前，個體係

以抗-GITR 抗體進行預處理，藉此降低個體復發風險至以表現 CAR 的細胞治療。

【0345】 在一實施例中，待移出之細胞群並非調節性 T 細胞或腫瘤細胞，但可以其他方式負向影響 CART 細胞之擴增及/或功能的細胞，例如表現 CD14、CDIIb、CD33、CD15 之細胞，或可能由潛在免疫抑制細胞表現之其他標記物。在一實施例中，此類細胞預期與調節性 T 細胞及/或腫瘤細胞同時移出、或在該耗盡之後移出、或以另一順序移出。

【0346】 本文所描述之方法可包括大於一個篩選步驟，例如大於一個耗盡步驟。藉由負向篩選來富集 T 細胞群，可例如以可引導至負向篩選細胞之獨特表面標記物的抗體組合而完成。其中一種方法為細胞分選及/或篩選，其經由負磁免疫黏附或流式細胞儀進行篩選，其係使用引導至負向篩選細胞所特有之表面標記物的單株抗體混合液。舉例而言，為了藉由負向篩選來富集 CD4+細胞，單株抗體混合液通常包括 CD14、CD20、CDIIb、CD16、HLA-DR 及 CD8 之抗體。

【0347】 本文所描述之方法可進一步包括自表現腫瘤抗原之群體移除細胞，例如，不包含 CD25 之腫瘤抗原，例如 CD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14 或 CDIIb，藉此提供 T 調節耗盡群體(例如，CD25+耗盡)及腫瘤抗原表耗盡細胞，其適於表現 CAR，如本文所述之 CAR。在一實施例中，表現腫瘤抗原的細胞係與 T 調節細胞(例如 CD25+細胞)同時移出。舉例而言，抗-CD25 抗體或其片段及抗腫瘤抗原抗體或其片段，可附著至同一基材(例如，微珠)上，其可用於移出細胞或抗-CD25 抗體或其片段，或該抗腫瘤抗原抗體或其片段可附著至別的微珠上，該混合物可用於移出該細胞。在其他實施例中，T 調節細胞(例如 CD25+細胞)之移出及表現腫瘤抗原的細胞之移出係依序發生，且可例如以任何順序發生。

【0348】 亦提供包括從表現檢查點抑制劑的群體中移出細胞的方法，例如本文描述的檢查點抑制劑，例如 PD1+細胞、FAG3+細胞和 TIM3+細胞之一或多者，從而提供 T 調節耗盡細胞群(例如 CD25+耗盡細胞)，和檢查點抑制劑耗盡

細胞(例如 PD1+、FAG3+及/或 TIM3+耗盡細胞)。例示性檢查點抑制劑包括 B7-H1、B7-1、CD160、P1H、2B4、PD1、TIM3、CEACAM (例如，CEACAM-1、CEACAM-3 及/或 CEACAM 5)、LAG3、TIGIT、CTLA-4、BTLA 及 LAIR1。在一實施例中，表現檢查點抑制劑的細胞係與 T 調節細胞(例如 CD25+細胞)同時移除。舉例而言，抗-CD25 抗體或其片段及抗檢查點抑制劑抗體或其片段，可附著至同一微珠上，其可用於移除該細胞或抗-CD25 抗體或其片段，以及該抗檢查點抑制劑抗體或其片段可附著至別的微珠上，該混合物可用於移除該細胞。在其他實施例中，T 調節細胞(例如 CD25+細胞)之移除及表現檢查點細胞之移除為依序的，且可例如以任何順序發生。

【0349】 在一實施例中，表現 IFN-g、TNFa、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、顆粒酶 B、及穿孔素或其他適當分子(例如其他細胞激素)之一或多者的 T 細胞群可被篩選出。用於篩選細胞表現之方法可例如藉由 PCT 公開案號：WO 2013/126712 描述之方法決定。

【0350】 就藉由正向或負向篩選來分離所希望之細胞群而言，可改變細胞和表面(例如，顆粒如微珠)的濃度。在某些態樣中，可能需要顯著降低微珠與細胞混合之體積(例如，增加細胞濃度)，以確保細胞與微珠之最大接觸。舉例而言，在一態樣中，使用每毫升 20 億個細胞之濃度。在一態樣中，使用每毫升 10 億個細胞之濃度。在另一態樣中，使用超過每毫升 1 億個細胞之濃度。在另一態樣中，使用每毫升 1000 萬、1500 萬、2000 萬、2500 萬、3000 萬、3500 萬、4000 萬、4500 萬或 5000 萬個細胞之細胞濃度。在又一態樣中，使用每毫升 7500 萬、8000 萬、8500 萬、9000 萬、9500 萬或 1 億個細胞的細胞濃度。在其他態樣中，可使用每毫升 1 億 2 千 5 百萬或 1 億 5 千萬個細胞的濃度。

【0351】 使用高濃度可導致細胞產率、細胞活化和細胞擴增之增加。此外，使用高細胞濃度可更有效捕捉弱表現標靶抗原的細胞(如 CD28-陰性 T 細胞)，或來自存在許多腫瘤細胞的樣本(例如，白血病血液、腫瘤組織等)。此類細胞群可具有治療價值且可期望獲得。例如，使用高濃度的細胞，可更有效地篩選

出具有通常較弱的 CD28 表現之 CD8+ T 細胞。

【0352】 在一相關態樣中，可能希望使用較低濃度的細胞。藉由顯著地稀釋 T 細胞混合物，在顆粒與細胞之間的表面(例如，顆粒如微珠)相互作用最小化。此篩選出表現大量希望的抗原，以結合至該顆粒之細胞。例如，CD4+ T 細胞表現較高位準之 CD28，且比稀釋濃度中之 CD8+ T 細胞更有效捕捉。

【0353】 在一態樣中，使用的細胞濃度為 5 X 10e6/ml。在其他態樣中，所用濃度可為約 1 X 10^5/ml 至 1 X 10^6/ml，及介於其之間的任何整數值。

【0354】 在其他態樣中，細胞可在 2 至 10°C 或室溫下、在旋轉器上以不同速度培育不同時間長度。用於刺激之 T 細胞亦可在洗滌步驟之後冷凍。希望不被理論束縛，冷凍及隨後解凍步驟係藉由移除細胞群中的顆粒細胞及一定程度之單核球，而提供更均一的產物。在移除血漿及血小板之洗滌步驟之後，細胞可懸浮於冷凍溶液中。雖然許多冷凍溶液和參數為本領域中已知的，且可用於本文中，但其中一種方法涉及使用含有 20% DMSO 和 8%人類血清白蛋白的 PBS，或含 10%葡聚醣 40 和 5%右旋糖、20%人類血清白蛋白和 7.5% DMSO、或 31.25% Plasmalyte-A 31.25%、右旋糖 5%、0.45% NaCl、10%葡聚醣 40 和 5%右旋糖、20%人類血清白蛋白、和 7.5% DMSO 之培養基，或其他含有例如 Hespan 和 PlasmaLyte A 的合適細胞冷凍培養基，然後將細胞以每分鐘 1°的速率冷凍至 -80°C，並儲存在液態氮儲存槽的氣相中。可使用其他經控制冷凍方法以及不經控制冷凍方法，立即於-20°C 或液態氮中進行。

【0355】 於某些態樣中，冷凍保存細胞係如本文所述解凍並洗滌，且允許在利用本發明之方法活化之前，在室溫下靜置一小時。

【0356】 本發明內文中亦涵蓋在可能需要如本文所述擴增細胞之前的某一時間點，自個體收集血液樣本或分離術產物。因此，可在需要的任何時間點收集待擴增的細胞來源，及期望的細胞，如經分離及冷凍以用於隨後之 T 細胞療法中的 T 細胞，用於任何數目之可受益於 T 細胞療法的疾病或病況，如本文所述者。

【0357】 在一態樣中，血液樣本或分離術係由一般健康之個體收集。在某些態樣中，血液樣本或分離術是取自一般健康但有罹患疾病風險之個體，但尚未發展出疾病，且感興趣細胞被分離出並冷凍，供日後使用。在某些態樣中，T細胞可擴增、冷凍且在之後的時間使用。在某些態樣中，樣本在患者被診斷出罹患本文所述的特定疾病之後不久，但在進行任何治療之前收集。

【0358】 在其他態樣中，細胞係由個體的血液樣本或分離術分離出，在進行任何數量的相關治療方式之前，包括但不限於經試劑如那他珠單抗(natalizumab)、依法珠單抗(efalizumab)、抗病毒劑、化學療法、放射療法、免疫抑制劑的試劑如環孢菌素、硫唑嘌呤、胺甲喋呤、黴酚酸酯和 FK506、抗體、或其他免疫清除劑如CAMPATH、抗CD3抗體、環孢素、氟達拉濱(fludarabine)、環孢菌素、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、黴酚酸、類固醇、FR901228 和放射線治療。

【0359】 在本發明的另一態樣中，T 細胞係獲自治療後留有功能性 T 細胞之患者中。在這方面，已觀察到在某些癌症治療後，特別是使用損害免疫系統的藥物治療後，在患者正常從治療中恢復的治療後不久，獲得的 T 細胞的品質可能是最佳的，或可增進其體外擴增的能力。

【0360】 同樣地，使用本文所述之方法進行離體操作後，這些細胞可處於用於增進植入和在體內擴增的較佳狀態。因此，在本發明之上下文中預期在此恢復階段收集血細胞，包括 T 細胞、樹突狀細胞、或造血細胞之其他細胞。此外，在某些態樣中，驅動(例如，以 GM-CSF 驅動)和調理方案可用於在個體中產生有利於特定細胞類型的再增殖、再循環、再生及/或擴增的條件，尤其是在確定的治療後時間窗口中。例示性細胞類型包括 T 細胞、B 細胞、樹突狀細胞及免疫系統之其他細胞。

【0361】 在一些實施例中，T 細胞群為二丙三醇激酶(DGK)缺失型。DGK 缺失細胞包括不表現 DGK RNA 或蛋白質，或具有降低或抑制 DGK 活性的細胞。DGK 缺失細胞可藉由基因方法生成，例如，投與 RNA 干擾劑，例如 siRNA、

shRNA、miRNA，以減少或預防 DGK 表現。或者，DGK 缺失細胞可利用本文所述的 DGK 抑制劑治療生成。

【0362】 在一實施例中，T 細胞群為 Ikaros 缺失細胞。Ikaros 缺失細胞包括不表現 Ikaros RNA 或蛋白質，或具有減少或抑制 Ikaros 活性的細胞，Ikaros 缺失細胞可藉由基因方法生成，例如，投與 RNA 干擾劑，例如 siRNA、shRNA、miRNA，以降低或阻止 Ikaros 表現。

【0363】 替代地，Ikaros 缺失細胞可藉由以 Ikaros 抑制劑(例如來那度胺(lenalidomide))治療來生成。在實施例中，T 細胞群為 DGK 缺失且 Ikaros 缺失，例如不表現 DGK 及 Ikaros，或具有降低或抑制的 DGK 及 Ikaros 活性。此類 DGK 及 Ikaros 缺失細胞可藉由本文所描述之任一方法產生。在一實施例中，該 NK 細胞係自該個體獲得。在另一實施例中，該 NK 細胞為 NK 細胞株，例如 NK-92 細胞株(Conkwest)。

同種異體 CAR 免疫效應細胞

【0364】 在本文所描述之實施例中，免疫效應細胞可為同種異體免疫效應細胞，例如 T 細胞或 NK 細胞。舉例而言，該細胞可為同種異體 T 細胞，例如缺乏功能性 T 細胞受體(TCR)及/或人類白血球抗原(HLA)，例如第 I 類 HLA 及/或第 II 類 HLA 之表現的同種異體 T 細胞。

【0365】 缺乏功能性 TCR 之 T 細胞可例如經改造，以使其不表現任何功能性 TCR 於其表面上、經改造以使其不表現包含功能性 TCR 之一或多個次單元、或經改造使其製造非常少之功能性 TCR 於其表面上。或者，該 T 細胞可表現實質上受損之 TCR，例如藉由表現 TCR 之一或多個次單元之突變或截短形式。術語「實質上受損之 TCR」意謂此 TCR 不會在宿主中引起不良免疫反應。

【0366】 本文所描述之 T 細胞可為例如經改造，使其不會表現功能性 HLA 於其表面上。舉例而言，本文所述之 T 細胞可經改造，以使得細胞表面表現的 HLA，例如，第 I 類 HLA 及/或第 II 類 HLA，向下調節。

【0367】 在一些實施例中，T 細胞可缺乏功能性 TCR 及功能性 HLA，例如第

I類HLA及/或第II類HLA。缺乏功能性TCR及/或HLA表現的經修飾T細胞，可藉由任何合適手段獲得，包括 TCR 或 HLA 之一或多個次單元的敲除(knock out)或壓制(knock down)。舉例而言，T 細胞可包括使用 siRNA、shRNA 壓制 TCR 及/或 HLA、成簇的規則間隔短回文重複序列(CRISPR)、轉錄活化劑類似效應子核酸酶(TALEN)、或鋅指核酸酶(ZFN)。

【0368】 在一些實施例中，該同種異體細胞可為不表現或以低位準表現抑制分子(例如，藉由本文所述之任何方法)的細胞。舉例而言，該細胞可為不表現或以低位準表現抑制分子的細胞，例如，其可降低表現CAR的細胞建立免疫效應反應之能力。抑制性分子之實例包括 PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14 或 CD270)、KIR、A2aR、第 1 類 MHC、第 2 類 MHC、GAL9、及腺苷。抑制性分子的抑制，例如藉由在DNA、RNA 或蛋白質層級上的抑制，可使表現 CAR 的細胞的表現度最佳化。在實施例中，抑制性核酸，例如抑制性核酸，例如 dsRNA，例如 siRNA 或 shRNA、成簇的規則間隔短回文重複序列(CRISPR)、轉錄激活因子樣效應核酸酶(TALEN)、或鋅指核酸內切酶(ZFN)，如本文所述，皆可使用。

siRNA 及 shRNA 抑制 TCR 或 HLA

【0369】 在一些實施例中，TCR 表現及/或 HLA 表現可在細胞中(如 T 細胞中)，使用 siRNA 或 shRNA(其靶向編碼 TCR 及/或 HLA 之核酸)抑制，及/或使用抑制性分子(例如 PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如，CEACAM-1、CEACAM-3 及/或 CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14 或 CD270)、KIR、A2aR、第 1 類 MHC、第 2 類 MHC、GAL9、及腺苷)抑制。

【0370】 siRNA 和 shRNA 以及例示性 shRNA 的表現系統在例如 2015 年 3 月 13 日提交的國際公開案號 WO2015/142675 的第 649 和 650 段中進行描述，其經

由引用整體併入。

用以抑制 TCR 或 HLA 之 CRISPR

【0371】 如本文所用，「CRISPR」或「用於 TCR 及/或 HLA 之 CRISPR」或「抑制 TCR 及/或 HLA 之 CRISPR」係指一組成簇的規則間隔短回文重複序列，或包含此類重複組之系統。如本文所用，「Cas」係指 CRISPR-相關蛋白。

【0372】 「CRISPR/Cas」系統係指衍生自 CRISPR 及 Cas 之系統，其可用於在細胞中(如 T 細胞中)，使 TCR 及/或 HLA 基因、及/或抑制分子(例如 PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (例如，CEACAM-1、CEACAM-3 及/或 CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14 或 CD270)、KIR、A2aR、第 1 類 MHC、第 2 類 MHC、GAL9、及腺苷)靜默及/或突變。CRISPR/Cas 系統及其用途描述於例如，於 2015 年 3 月 13 日提交之國際公開案號 WO2015/142675 第 651-658 段中，其經由引用全部併入本文中。

用以抑制 TCR 及/或 HLA 之 TALEN

【0373】 「TALEN」或「用於 HLA 和/或 TCR 之 TALEN」或「抑制 HLA 和/或 TCR 之 TALEN」是指一種轉錄激活因子類似效應核酸酶，其為一種人工核酸酶，可用於在細胞中(如 T 細胞中)編輯 HLA 及/或 TCR 基因、及/或抑制分子(例如 PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (例如，CEACAM-1、CEACAM-3 及/或 CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14 或 CD270)、KIR、A2aR、第 1 類 MHC、第 2 類 MHC、GAL9、及腺苷)。

【0374】 TALEN 及其用途係描述於例如，於 2015 年 3 月 13 日所提交之國際公開案號 WO20 15/142675 第 659-665 段中，其經由引用全部併入本文中。

用以抑制 HLA 及/或 TCR 之鋅指核酸酶

【0375】 「ZFN」或「鋅指核酸酶」或「用於 HLA 及/或 TCR 之 ZFN」或「抑制 HLA 及/或 TCR 之 ZFN」係指一種鋅指核酸酶，其為一種人工核酸酶，可用於在細胞中(如 T 細胞中)編輯 HLA 及/或 TCR 基因、及/或抑制分子(例如 PD1 、 PD-L1 、 PD-L2 、 CTLA4 、 TIM3 、 CEACAM(例 如 ， CEACAM-1 、 CEACAM-3 及/或 CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160 、 2B4 、 CD80 、 CD86 、 B7-H3 (CD276) 、 B7-H4 (VTCN1) 、 HVEM (TNFRSF14 或 CD270)、KIR、A2aR、第 1 類 MHC、第 2 類 MHC、GAL9、及腺苷)

【0376】 ZFN 及其用途描述於例如，於 2015 年 3 月 13 日所提出之國際公開案 WO2015/142675 第 666-671 段中，其作為參考文獻整體引述。

端粒酶之表現

【0377】 雖然不希望受到任何特定理論之束縛，但在一些實施例中，治療性 T 細胞由於 T 細胞中之縮短端粒，而對患者具有短期持續性；因此，以端粒酶基因轉染可延長 T 細胞之端粒，並提高患者中 T 細胞之持續性。請參見 Carl June, “Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic”, Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007)。因此，在一實施例中，免疫效應細胞，例如 T 細胞，係異位表現端粒酶次單元，例如端粒酶之催化次單元，例如 TERT，例如 hTERT。在一些態樣中，本發明提供一種產生表現 CAR 的細胞之方法，其包含使細胞與編碼端粒酶次單元之核酸接觸，例如端粒酶之催化次單元，例如，TERT，例如 hTERT。細胞可在與編碼 CAR 之構築體接觸之前、同時或之後與核酸接觸。

【0378】 在一態樣中，本揭示提供一種製造免疫效應細胞群之方法(例如 T 細胞、NK 細胞)。在一實施例中，該方法包含：提供一免疫效應細胞群(例如，T 細胞或 NK 細胞)、將該免疫效應細胞群與編碼一 CAR 的核酸接觸；以及將該免疫效應細胞群與編碼端粒酶次單元(例如，hTERT)的核酸接觸，在允許 CAR

及端例酶表現之條件下。

【0379】 在一實施例中，該編碼端粒酶次單元之核酸為 DNA。在一實施例中，該編碼端粒酶次單元之核酸包含一驅動子，其可驅動端粒酶次單元 AAC51724.1 之表現(Meyerson 等人，“hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization” Cell，第 90 卷，第 4 期，1997 年 8 月 22 日，第 785-795 頁)。

治療方法

【0380】 本發明係有關於包含向個體投與如本文所述的抗 GCC 抗原結合分子的治療方法。在一些實施例中，本文揭示的抗 GCC CAR 和抗原結合分子，可用於治療或預防哺乳動物疾病的方法中。在此方面，一實施例係提供一種治療或預防哺乳動物癌症的方法，包含向哺乳動物投與有效治療或預防哺乳動物癌症之量的 CAR、核酸、重組表現載體、宿主細胞、細胞群、抗體及/或其抗原結合部分，及/或醫藥組成物。本發明亦相關於如本文所述的抗 GCC 抗原結合分子(例如 sdAb 或 CAR)，其用於治療疾病。本發明亦相關於如本文所述的抗 GCC 抗原結合分子(例如 sdAb 或 CAR)，其用於治療癌症。本發明亦相關於如本文所述的抗 GCC 抗原結合分子(例如 sdAb 或 CAR)，其用於製備治療癌症的藥物。

【0381】 本文所述的組成物投與可以任何方便的方式進行，包括藉由氣霧吸入、注射、攝取、輸血、植入或移植。本文所述的組成物可經動脈、皮下、皮內、腫瘤內、結內、髓內、肌肉內、藉由靜脈內(i.v.)注射或腹膜內投與患者。在一實施例中，本文所述之例如包含有表現 CAR 的細胞之組成物係藉由皮內或皮下注射投與患者。在一實施例中，本文所述之例如包含有表現 CAR 的細胞的組成物係藉由靜脈注射投與。本文所述之例如包含有表現 CAR 的細胞的組成物係可直接注射到腫瘤、淋巴結或感染部位。

【0382】 通常可陳述包含本文所描述之免疫效應細胞的醫藥組成物，可以

10^4 至 10^9 細胞/公斤體重之劑量投與，在一些實例中為 10^5 至 10^6 細胞/公斤體重，包括此等範圍中的所有整數值。免疫效應細胞組成物亦可以此等劑量多次投與。該細胞可使用免疫療法中通常已知的輸注技術投與(參見例如 Rosenberg 等人，New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)。

【0383】 在某些態樣中，可能希望將經活化免疫效應細胞投與個體，之後再抽血(或進行分離術)、依據本發明由其中活化細胞、及將這些經活化及擴增細胞再輸注至該患者中。此流程可以每隔幾周執行數次。在某些態樣中，細胞可從 10cc 到 400cc 的抽血中活化。在某些態樣中，細胞從 20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc 或 100cc 的抽血中活化。

【0384】 在一些實施例中，該抗 GCC CAR 係於供體細胞上表現。在一些實施例中，用於 T 細胞療法之供體 T 細胞係得自患者(例如，用於自體 T 細胞療法)。在其他實施例中，用於T細胞療法之供體T細胞得自非患者之個體(例如，同種異體 T 細胞療法)。CAR^+ T 細胞可以治療有效量投與。舉例而言，治療有效量之 T 細胞可為至少約 10^4 個細胞、至少約 10^5 個細胞、至少約 10^6 個細胞、至少約 10^7 個細胞、至少約 10^8 個細胞、至少約 10^9 個細胞、或至少約 10^{10} 個細胞。

【0385】 在一些實施例中，T 細胞之治療有效量為約 10^4 個細胞、約 10^5 個細胞、約 10^6 個細胞、約 10^7 個細胞或約 10^8 個細胞。在一些實施例中，CAR T 細胞之治療有效量為約 2 X 10^6 個細胞/kg、約 3 X 10^6 個細胞/kg、約 4 X 10^6 個細胞/kg、約 5 X 10^6 個細胞/kg、約 6 X 10^6 個細胞/kg、約 7 X 10^6 個細胞/kg、約 8 X 10^6 個細胞/kg、約 9 X 10^6 個細胞/kg、約 1 X 10^7 個細胞/kg、約 2 X 10^7 個細胞/kg、約 3 X 10^7 個細胞/kg、約 4 X 10^7 個細胞/kg、約 5 X 10^7 個細胞/kg、約 6 X 10^7 個細胞/kg、約 7 X 10^7 個細胞/kg、約 8 X 10^7 個細胞/kg、或約 9 X 10^7 個細胞/kg。在一些實施例中，CAR 陽性的活 T 細胞之治療有效量介於約 1 X 10^6 至約 2 X 10^6 個 CAR 陽性的活 T 細胞每公斤體重之間，直至最大劑量約 1 x 10^8 個 CAR 陽性的活 T 細胞。

【0386】 在一些實施例中，CAR 陽性的活 T 細胞之治療有效量在約 0.25 X 10^6 至 2 X 10^6 之間。在一些實施例中，CAR 陽性的活 T 細胞之治療有效量為 0.25 x 10^6、0.3 x 10^6、0.4 x 10^6、約 0.5 x 10^6、約 0.6 x 10^6、約 0.7 x 10^6、約 0.8 x 10^6、約 0.9 x 10^6、約 1.0 x 10^6、約 1.1 x 10^6、約 1.2 x 10^6、約 1.3 x 10^6、約 1.4 x 10^6、約 1.5 x 10^6、約 1.6 x 10^6、約 1.7 x 10^6、約 1.8 x 10^6、約 1.9 x 10^6、或約 2.0 x 10^6 個 CAR 陽性的活 T 細胞。

【0387】 在一些實施例中，CAR 陽性的活 T 細胞之治療有效量在約 0.4 x 10^8 至約 2 x 10^8 個 CAR 陽性存活 T 細胞之間。在一些實施例中，CAR 陽性的活 T 細胞之治療有效量為約 0.4 x 10^8、約 0.5 x 10^8、約 0.6 x 10^8、約 0.7 x 10^8、約 0.8 x 10^8、約 0.9 x 10^8、約 1.0 x 10^8、約 1.1 x 10^8、約 1.2 x 10^8、約 1.3 x 10^8、約 1.4 x 10^8、約 1.5 x 10^8、約 1.6 x 10^8、約 1.7 x 10^8、約 1.8 x 10^8、約 1.9 x 10^8、或約 2.0 x 10^8 個 CAR 陽性的活 T 細胞。

【0388】 在一些實施例中，表現 CAR 之細胞之劑量(例如，本文所描述之表現 CAR 的細胞，例如，表現 GCC CAR 的細胞)包含約 1 x 10^6 細胞/m^2 至約 1 x 10^9 細胞/m^2，例如，約 1 x 10^7 細胞/m^2 至約 5 x 10^8 細胞/m^2，例如，約 1.5 x 10^7 細胞/m^2、約 2 x 10^7 細胞/m^2、約 4.5 x 10^7 細胞/m^2、約 10^8 細胞/m^2、約 1.2 x 10^8 細胞/m^2、或約 2 x 10^8 細胞/m^2。

【0389】 本發明包括(除了其他事項之外)一種細胞療法，其中 T 細胞經基因修飾以表現嵌合抗原受體(CAR)，且該 CAR T 細胞輸注至有需要之接受者中。該輸注細胞能殺傷接受者的腫瘤細胞。與抗體療法不同，經 CAR 修飾之 T 細胞可在體中複製，產生長期持久性，其可導致持續腫瘤控制。在各態樣中，在投與 T 細胞至患者後，該投與患者的 T 細胞在患者體內持續至少四個月、五個月、六個月、七個月、八個月、九個月、十個月、十一個月、十二個月、十三個月、十四個月、十五個月、十六個月、十七個月、十八個月、十九個月、二十個月、二十一個月、二十二個月、二十三個月、兩年、三年、四年或五年。

【0390】 在一些實施例中，該表現 GCC CAR 的細胞係以多次劑量(例如，第

一劑量、第二劑量及視情況第三劑量)投與。在實施例中，該方法包含治療患有癌症(例如大腸直腸癌)之個體(例如成人個體)，其包含向該個體投與第一劑量、第二劑量及視情況一或多次額外劑量，每一劑量包含表現 CAR 分子(例如 GCC CAR 分子，例如在表 7 中提供之 CAR 分子)之免疫效應細胞。

【0391】 在實施例中，該方法包含投與每公斤 2 至 5 x 10^6 個表現 CAR 的活細胞之劑量，其中該個體之體重小於 50 kg；或投與 1.0 至 2.5 x 10^8 個表現 CAR 的活細胞之劑量，其中該個體之體重至少 50 kg。

【0392】 在實施例中，向該個體例如兒童或成人個體投與單一劑量。

【0393】 在實施例中，該劑量依順序天數投與，例如，在第 1 天投與第一劑量，第 2 天投與第二劑量，且視情況在第 3 天投與第三劑量(若有投與)。

【0394】 在實施例中，投與第四、第五或第六劑量或更多劑量。

【0395】 在實施例中，該第一劑量包含約 10%總劑量，第二劑量包含約 30%總劑量，且第三劑量包含約 60%總劑量，其中前述百分比之總和為 100%。在實施例中，第一劑量包含總劑量之約 9-11%、8-12%、7-13%或 5-15%。在實施例中，第二劑量包含總劑量之約 29-31%、28-32%、27-33%、26-34%、25-35%、24-36%、23-37%、22-38%、21-39%或 20-40%。在實施例中，第三劑量包含總劑量之約 55-65%、50-70%、45-75%或 40-80%。在實施例中，總劑量係指在 1 週、2 週、3 週或 4 週期間所投與之表現 CAR 的活細胞總數。在投與兩個劑量的一些實施例中，總劑量係指以第一及第二劑量向個體所投與之表現 CAR 的活細胞數目總和。在投與三個劑量的一些實施例中，總劑量係指在第一、第二及第三劑量中向個體所投與之表現 CAR 的活細胞數目總和。

【0396】 在實施例中，該劑量根據其中表現 CAR 的活細胞數目來測量。CAR 的表現可使用結合至 CAR 分子之抗體分子及可偵測標記，例如藉由流式細胞量測術來測量。存活率可例如藉由細胞儀測量。

【0397】 本發明亦包括一種細胞療法類型，其中免疫效應細胞例如 NK 細胞或 T 細胞經修飾，例如藉由體外轉錄 RNA，以暫時表現嵌合抗原受體(CAR)，

並將表現 CAR 的細胞(例如，CART)輸注至有需要之接受者中。該輸注細胞能殺傷接受者的癌細胞。因此，在各態樣中，投與患者之表現 CAR 的細胞(例如 T 細胞)，在投與該表現 CAR 的細胞(例如 T 細胞)之後存在於患者體內小於一個月，例如，三週、兩週、一週。

【0398】 不希望受限於任何特定理論，由經 CAR 修飾之 T 細胞引發的抗癌免疫反應可為主動或被動免疫反應，或替代地可歸因於直接與間接免疫反應。在一態樣中，經 CAR (例如，GCC-CAR)轉導之 T 細胞展現特定促發炎性細胞激素分泌，及對表現標靶抗原(例如，GCC)之人類癌細胞具有效細胞溶解活性、具可溶性標靶抗原抑制抗性、介導鄰近殺傷、並介導已建立的人類癌症的消退。舉例而言，在表現標靶抗原的癌症之非均質區域中的無抗原癌細胞，易感於先前對相鄰抗原-陽性癌細胞產生反應之標靶抗原靶向 T 細胞的間接破壞。

【0399】 在一態樣中，本發明特徵在於一種治療個體之癌症的方法。該方法包含向該個體投與一治療，其包括投與表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)，以於該個體中治療該癌症。在一實施例中，該表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)之治療會導致以下之一或多現象：表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)的抗腫瘤活性改善或增加；表現 CAR 的細胞的增殖或持久性增加；表現 CAR 的細胞的浸潤改善或增加；改善對腫瘤進展的抑制；延緩腫瘤進展；抑制或減少癌細胞增殖；及/或減少腫瘤負荷，例如腫瘤體積或大小。在一實施例中，該治療導致表現 CAR 的細胞之持續性增加及/或表現 CAR 的細胞之持續性增加、及較低例如降低的復發風險。

【0400】 本發明提供抑制或降低表現抗原的(例如，表現 GCC 的)細胞群之增殖的方法。在一實施例中，該方法包含投與 CAR 療法(例如，表現 CAR 的細胞群)。在某些實施例中，相對於接受不同癌症療法的個體中之細胞及/或癌細胞的數量、數目、含量或百分比，本文所描述之療法在具有抗原(例如 GCC)或與表現抗原的(例如，表現 GCC 的)細胞相關的另一種癌症之個體或動物模型中係降低細胞及/或癌細胞的數量、數目、含量或百分比至少 5%、10%、至少 15%、

至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%。在一實施例中，該個體為哺乳動物。在一些實施例中，該個體為人類。

【0401】 本發明亦提供用於預防、治療及/或管理一病症之方法，例如，與表現抗原的細胞(例如，表現 GCC 的細胞)相關之病症(例如，本文所述之癌症)，該方法包含向有需要的個體投與表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞、表現 CAR 的細胞群)。在一態樣中，該個體為人類。

【0402】 在一態樣中，本發明係關於一種抑制癌細胞生長(例如，表現抗原的(例如表現 GCC 的)癌細胞)之方法，其包含使該癌細胞與表現 CAR 的(例如，表現 GCC CAR 的)細胞，如本文所述之 GCC CART 細胞接觸，使得 CART 回應於抗原而被活化並靶向癌細胞，其中癌症的生長被抑制。

【0403】 本發明亦提供用於預防、治療及/或管理一疾病之方法，例如，與表現抗原的(例如表現 GCC 的)細胞相關之疾病(例如，表現該抗原(如 GCC)之癌症)，該方法包含向有需要的個體投與表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)，其結合至該表現抗原的細胞。在一些實施例中，該個體為人類。

【0404】 本發明亦提供用於預防、治療及/或管理與表現抗原的(例如，表現 GCC 的)細胞相關之疾病的方法，該方法包含向有需要的個體投與本發明之 CART 細胞(例如，抗 GCC CART 細胞)，其結合至該表現抗原的細胞。在一態樣中，該個體為人類。

【0405】 本發明亦提供預防與抗原表現(例如，表現 GCC 的)細胞相關之癌症復發之方法，該方法包含向有需要的個體投與本發明之 CART 細胞(例如，抗 GCC CART 細胞)，其結合至該表現抗原的細胞。在一態樣中，該方法包含向有需要的個體投與有效量的 CART 細胞(例如，抗 GCC CART 細胞)，如本文所述，其以在另一療法中有效之量結合至該表現抗原的(如表現 GCC 的)細胞。

【0406】 一實施例進一步包含在投與本文所揭示之 CAR 之前，使哺乳動物

進行淋巴耗盡。淋巴耗盡的實例包括但不限於：非清髓性淋巴細胞清除化療、清髓性淋巴細胞清除化療、全身輻射照射等。

【0407】　在一特定例示性態樣中，個體可進行白血球分離術，其中白血球係經收集、富集或體外耗盡，以篩選及/或分離出有興趣的細胞，例如 T 細胞。這些 T 細胞分離株可藉由本領域中已知的方法擴增並經處理，使其可引入本發明之一或多個 CAR 構築體，藉此創造本發明之 CAR T 細胞。有需要的個體隨後可接受高劑量化療的標準治療，之後進行周邊血液幹細胞移植。在某些態樣中，在移植之後或同時進行移植，個體接受本發明擴增的表現 CAR 的細胞的輸注。在另一態樣中，在手術前或手術後投與經擴增的細胞。

【0408】　就其中投與宿主細胞或細胞群的方法目的而言，細胞可為與該哺乳動物同種異體或自體的細胞。較佳地，該細胞為與該哺乳動物自體。如本文所用，同種異體是指衍生自與引入材料的個體相同物種之不同動物的任何材料。當一或多個基因座上的基因不相同時，該二或多個個體被稱為彼此同種異體。在一些態樣中，來自同一物種個體的同種異體材料可能在基因上完全不同，而有抗原性相互作用。如本文所用，「自體」是指衍生自同一個體的任何材料，之後將其重新引入該個體。

【0409】　本文所提及之哺乳動物可為任何哺乳動物。如本文所用，術語「哺乳動物」是指任何哺乳動物，包括但不限於：嚙齒目哺乳動物，例如小鼠和倉鼠，以及兔形目哺乳動物，例如兔。哺乳動物可來自食肉目，包括貓科動物(貓)和犬科動物(狗)。哺乳動物可來自偶蹄目，包括牛(母牛)和豬(豬)，或來自偶蹄目，包括馬(馬)。哺乳動物可為靈長類、四足猴(Ceboids)或原猴(Simoids)(猴子)或類人猿目(人類和猿)。在一些實施例中，該哺乳動物為人類。

【0410】　關於所述方法，該癌症可為任何癌症，包括急性淋巴細胞癌、急性骨髓性白血病、肺泡橫紋肌肉瘤、膀胱癌(例如，膀胱肉瘤)、骨癌、腦癌(例如，神經管母細胞瘤)、乳癌、肛門癌、肛管癌或肛門直腸癌、眼癌、肝內膽管癌、關節癌、頸部癌、膽囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌，或中耳癌、口腔癌、外陰

癌、慢性淋巴細胞白血病、慢性骨髓癌、大腸癌、食道癌、子宮頸癌、纖維肉瘤、胃腸道類癌瘤、頭頸癌(如頭頸鱗狀細胞癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、腎癌、喉癌、白血病、液體腫瘤、肝癌、肺癌(例如，非小細胞肺癌和肺腺癌)、淋巴瘤、間皮瘤、肥大細胞瘤、黑色素瘤、多發性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、B-慢性淋巴細胞白血病、毛細胞白血病、急性淋巴細胞白血病(ALL)和勃氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、卵巢癌、胰臟癌、腹膜癌、大網膜癌和腸系膜癌、咽癌、前列腺癌、直腸癌、腎癌、皮膚癌、小腸癌、軟組織癌、實體瘤、滑膜肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲狀腺癌和輸尿管癌之任一者。

【0411】 在某些實施例中，該癌症是胃腸癌。在一些實施例中，該癌症是胃癌。在一些實施例中，該癌症是大腸直腸癌。在一些實施例中，該癌症是大腸癌。在一些實施例中，該癌症具有 GCC 的異常表現。

【0412】 如本文所用，術語「治療」和「預防」以及其衍生詞不一定意味著100%或完全治療或預防。相反地，存在不同程度的治療或預防，本領域普通技術人員認為其具有潛在益處或治療效果。在此方面，該方法可提供任何量或任何位準的哺乳動物癌症的治療或預防。

【0413】 此外，由該方法提供的治療或預防可包括治療或預防一或多種待治療或預防的疾病(例如癌症)的病況或症狀。此外，出於本文目的，「預防」可包括延遲疾病或其症狀或病況的發作。

【0414】 另一實施例提供一種偵測哺乳動物中癌症存在的方法，包含：(a)將包含來自哺乳動物的一或多個細胞的樣本，與該抗原結合分子(例如單域抗體)、其抗原結合部分或醫藥組成物接觸，藉此形成一複合物，(b)並偵測該複合物，其中偵測到該複合物表示該哺乳動物中存在癌症。在一些實施例中，該接觸可在哺乳動物的體外或體內發生。在一些實施例中，該接觸是在活體外。

【0415】 該樣本可藉由任何合適的方法獲得，例如活體切片或屍體解剖。活體切片是從個體中取出組織及/或細胞。此取出可以是從該個體收集組織及/或細胞，以便對取出的組織及/或細胞進行實驗。此實驗可包括測定該個體是否具

有及/或正患有某病症或疾病狀態的實驗。該病症或疾病可為如癌症。

【0416】 關於在哺乳動物中偵測增殖性病症(例如癌症)的存在之方法之一實施例，該包含哺乳動物細胞的樣本可為包含全細胞、其裂解物或全細胞裂解物之分液(例如細胞核或細胞質分液、完整蛋白分液或核酸分液)。若樣本包含全細胞，則該細胞可為哺乳動物的任何細胞，例如任何器官或組織的細胞，包括血液細胞或內皮細胞。

【0417】 此外，複合物的偵測可經由本領域中已知的多種方式進行。例如，本文所述的 CAR、多肽、蛋白質、核酸、重組表現載體、宿主細胞、細胞群或抗體或其抗原結合部分，可經可偵測標記物標記，例如放射性同位素、螢光基團(例如異硫氰酸螢光素(FITC)、藻紅蛋白(PE))、酵素(例如鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶)、及如前述所揭示之元素顆粒(例如金顆粒)。

【0418】 測試 CAR 辨識標靶細胞的能力和抗原特異性的方法為本領域中已知的。例如，Clay 等人，J. Immunol, 163: 507-513 (1999)，揭示測量細胞因子(例如干擾素-γ、顆粒細胞/單核細胞集落刺激因子(GM-CSF)、腫瘤因子 a (TNF-α)或介白素 2 (IL-2))釋放的方法。此外，CAR 功能可藉由量測細胞之細胞毒性來評估，如 Zhao 等人， J. Immunol， 174：4415-4423 (2005)中所述。

【0419】 另一實施例提供本發明的 CAR、核酸、重組表現載體、宿主細胞、細胞群、抗體或其抗原結合部分及/或藥物組合物之用途，用於治療或預防哺乳動物之增殖性疾病，例如癌症。該癌症可為本文所述的任何癌症。

【0420】 任何投與方法均可用於所揭示的治療劑，包括局部和全身投與。例如可使用局部、口服、血管內(例如靜脈內)、肌肉內、腹膜內、鼻內、皮內、鞘內和皮下投與。特定的投與方式和給藥方案將由主治臨床醫生選擇，考慮到病例的細節(例如個體、疾病、所涉及的疾病狀態以及治療是否為預防性)。在投與大於一種試劑或組成物的情況下，可使用一或多種投與途徑；例如，化療劑可口服投與，而抗體或抗原結合片段或共軛物或組成物可靜脈投與。投與方法包括注射，其中 CAR、CAR T 細胞、共軛物、抗體、抗原結合片段或組成物，

係於無毒的醫藥學上可接受的載體中提供，例如水、生理食鹽水、林格氏溶液、右旋糖溶液、5%人類血清白蛋白、非揮發性油、油酸乙酯或微脂體。在一些實施例中，可使用所揭示的化合物之局部投藥，例如藉由將抗體或抗原結合片段施加至已移除腫瘤的組織區域，或懷疑傾向於發展腫瘤的區域。在一些實施例中，包括治療有效量的抗體或抗原結合片段的醫藥製劑的持續性腫瘤內(或腫瘤附近)釋放可能有助益。在其他實例中，共軛物作為滴眼劑局部施加至角膜，或經玻璃體內施加至眼睛。

【0421】 所揭示的治療劑可配製成適合精確劑量單獨投藥的單位劑型。此外，所揭示的治療劑可以單劑量或多劑量方案投藥。多劑量方案為其中主要治療過程可為大於一個單獨的劑量，例如 1 至 10 個劑量，之後根據需要在隨後的時間間隔投與其他劑量，以維持或加強該組成物的作用。治療可涉及在幾天至幾個月甚至幾年的時間內，每天或每天多次投與化合物。因此，該投藥方案也將，至少部分地，基於待治療對象的特定需要而決定，並將取決於投藥醫師的判斷。

【0422】 在一實施例中，該 CAR 被引入免疫效應細胞中，例如，使用體外轉錄，且該個體(例如人類)接受本發明的表現 CAR 的細胞的初始投與，以及之後的表現 CAR 的細胞的一次或多次投與，其中該一或多次後續投與在少於 15 天的時間內投與，例如在前次投與之後的 14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3 或 2 天。在一實施例中，每周向該個體(例如人類)大於一次投與本發明之表現 CAR 的細胞，例如每星期投與 2、3 或 4 次。在一實施例中，該個體(例如人類個體)每週接受大於一次的表現 CAR 的細胞投與(例如，每週 2 次、3 或 4 次投與)(本文中亦稱為一循環)，接著一週不投與表現 CAR 的細胞，且接著向個體投與一或多次額外的表現 CAR 的細胞投與(例如，每週大於一次的表現 CAR 的細胞投與)。在另一實施例中，該個體(例如人類個體)接受大於一個表現 CAR 的細胞循環，且各循環之間的時間小於 10、9、8、7、6、5、4 或 3 天。在一實施例中，每隔一天投與表現 CAR 的細胞一次，每星期投與 3 次。在一實施例中，投與本發明之表現 CAR 的細胞至少二、三、四、五、六、七、八或更多周。

【0423】 抗體或共軛物之典型劑量範圍可介於約0.01至約30 mg/kg，如約0.1至約 10 mg/kg。

【0424】 在特定實例中，投與該個體一治療性組成物，其包括共軛物、抗體、組成物、CAR、CAR T 細胞或額外試劑之一或多者，在每日多次投藥時程下，例如至少連續兩天、連續 10 天等，例如數週、數月或數年。在一實例中，向該個體投與共軛物、抗體、組成物或額外試劑一段時間，至少 30 天如至少 2 個月、至少 4 個月、至少 6 個月、至少 12 個月、至少 24 個月、或至少 36 個月。

【0425】 在一些實施例中，所揭示的方法包括向該個體提供手術、放射療法及/或化學治療，與所揭示之抗體、抗原結合片段、共軛物、CAR 或表現 CAR 的 T 細胞之組合(例如，依次、實質上同時或同時)。此類試劑及治療之方法及治療劑量為熟習此項技術者已知的，且可由熟練臨床醫師決定。額外試劑之製備及投與時程可根據製造商之指示或由熟練之執業人員依經驗決定。此類化學療法之製備與投藥時程亦描述於 Chemotherapy Service, (1992), M. C. Perry 編，Williams & Wilkins, Baltimore, Md。

【0426】 在一些實施例中，該組合療法可包括向個體投與治療有效量之額外癌症抑制劑。可與該組合療法一起使用之額外治療劑的非限制性實例包括微管結合劑、DNA 嵌合劑或交聯子、DNA 合成抑制劑、DNA 及 RNA 轉錄抑制劑、抗體、酵素、酵素抑制劑、基因調節劑及血管生成抑制劑。這些試劑(其以治療有效量投與)及治療可單獨或組合使用。舉例而言，任何適合之抗癌或抗血管生成劑可與本文所揭示之 CARS、CAR-T 細胞、抗體、抗原結合片段或共軛物組合投與。此類試劑之方法及治療劑量為熟習此項技術者已知的，且可由熟練臨床醫師決定。

【0427】 其他化學治療劑包括但不限於：烷化劑，例如氮芥(例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、氯甲鹼(chlormethine)、環磷醯胺、異環磷醯胺和美法崙(melphalan))、亞硝基脲(例如卡莫司汀(carmustine)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)和鏈脲佐菌素(streptozocin))、鉑化合物(例如，卡鉑

(carboplatin)、順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)和 BBR3464)、白消安(busulfan)、達卡巴嗪(dacarbazine)、氮乙胺(mechlorethamine)、丙卡巴肼(procarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、噻替帕(thiotepa)和烏拉莫司汀(uramustine)；抗代謝物，例如葉酸(例如甲胺蝶呤(methotrexate)、培美曲塞(pemetrexed)和雷替曲塞(raltitrexed))、嘌呤(例如克拉屈濱(cladribine)、氯法拉濱(clofarabine)、氟達拉濱(fludarabine)、巰基嘌呤(mercaptopurine)和硫鳥嘌呤(tioguanine))、嘧啶(例如卡培他濱(capecitabine))、阿糖胞苷(cytarabine)、氟尿嘧啶(fluorouracil)和吉西他濱(gemcitabine)；植物生物鹼，例如鬼臼屬(例如，依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(etoposide))、紫杉烷(例如，多西紫杉醇(docetaxel)和紫杉醇(paclitaxel))、長春花(例如，長春鹼(paclitaxel)、長春新鹼(paclitaxel)、長春地辛(vindesine)和長春瑞濱(vindesine))；細胞毒性/抗腫瘤抗生素，例如蒽環家族抗生素(例如柔紅黴素(vindesine)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊達比星(epirubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)和伐柔比星(valrubicin))、博來黴素(bleomycin)、利福平(rifampicin)、羥基脲和絲裂黴素；拓撲異構酶抑制劑，例如拓撲替康(topotecan)和伊立替康(irinotecan)；單克隆抗體，例如阿崙單抗(alemtuzumab)、貝伐單抗(alemtuzumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、吉姆單抗(gemtuzumab)、利妥昔單抗(rituximab)、帕尼單抗(panitumumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)和曲妥珠單抗(trastuzumab)；光敏劑，例如胺基乙醯丙酸、胺基乙醯丙酸甲酯、泊芬鈉(porfimer sodium)和維替泊芬(verteporfin)；和其他藥物，如阿利維 A 酸(alitretinoin)、阿曲他明(altretamine)、安吖啶(amsacrine)、阿那格雷(anagrelide)、三氧化二砷、天冬醯胺酶、阿西替尼(axitinib)、貝沙羅汀(bexarotene)、貝伐單抗(bevacizumab)、硼替佐米(bortezomib)、塞來昔布(celecoxib)、地尼白介素(denileukin diftitox)、厄洛替尼(erlotinib)、雌莫司汀(estramustine)、吉非替尼(gefitinib)、羥基甲醯胺、伊馬替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、噴司他丁(pentostatin)、馬索普考(masoprocol)、米托坦(mitotane)、培門冬酶(pegaspargase)、他莫昔芬

(tamoxifen)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、威羅非尼(vemurafinib)、凡德他尼(vandetanib vandetanib)和維甲酸(tretinoin)。此類試劑的選擇和治療劑量是本領域技術人員已知的，並可由熟練的臨床醫生決定。

【0428】 考慮用於組合治療的一般化學治療劑包括阿那曲唑(anastrozole) (Arimidex®)、比卡魯胺(bicalutamide) (Casodex®)、硫酸博來黴素(bleomycin sulfate) (Blenoxane®)、白消安(busulfan) (Myleran®)、白消安注射液(Busulfex®)、卡培他濱(capecitabine) (Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脫氧-5-氟胞苷、卡鉑(carboplatin) (Paraplatin®)、卡莫司汀(carmustine) (BiCNU®)、苯丁酸氮芥(chlorambucil) (Leukeran®)、順鉑(cisplatin) (Platinol®)、克拉屈濱(cladribine) (Leustatin®)、環磷醯胺 (Cytoxan® 或 Neosar®)、賽德薩(cytarabine)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside) (Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂質體注射液 (DepoCyt®)、達卡巴嗪(dacarbazine) (DTIC-Dome®)、放線菌素(dactinomycin) (Actinomycin D, Cosmegan)、鹽酸柔紅黴素(daunombicin hydrochloride)(Cembidine®)、檸檬酸柔紅黴素脂質體注射液(DaunoXome ®)、地塞米松(dexamethasone)、多西他賽(docetaxel)(Taxotere®)、鹽酸多柔比星(doxorubicin hydrochloride (Adriamycin®, Rubex®)) (Adriamycin®、Rubex®)、依托泊苷(etoposide) (Vepesid®)、磷酸氟達拉濱(fludarabine phosphate) (Fludara®)、5-氟尿嘧啶 (Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(flutamide) (Eulexin®)、替扎西替濱(tezacitibine)、吉西他濱(Gemcitabine) (二氟脫氧胞苷)、羥基脲(Hydrea®)、伊達比星(Idarubicin) (Idamycin®)、異環磷醯胺(IFEX®)、伊立替康(irinotecan) (Camptosar®)、L-天冬醯胺酶 (ELSPAR®)、亞葉酸鈣、美法崙(melphalan) (Alkeran®)、6-巰基嘌呤 (Purinethol®)、甲胺蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(mitoxantrone) (Novantrone®))、美拉塔格(mylotarg)、紫杉醇(Taxol®)、必帝(phoenix)(Yttrium90/MX-DTPA)、噴司他丁(pentostatin)、普立非普山 20 (polifeprosan 20)與卡莫司汀植入物 (Gliadel®)、他莫昔芬檸檬酸鹽(tamoxifen citrate)(Nolvadex®)、替尼泊苷(teniposide) (Vumon®)、6-硫鳥嘌呤、噻替派(thiotepa)、替拉扎明(tirapazamine) (Tirazone®)、注射用鹽酸托泊替康

(topotecan) (Hycamptin®)、長春鹼(vinblastine) (Velban®)、長春新鹼(vincristine) (Oncovin®)和長春瑞濱(vinorelbine) (Navelbine®)。

【0429】 例示性烷化劑揭示於國際申請案 WO 2016/164731，第 270-271 頁，其於 2016 年 4 月 8 日提交，其全部內容經由引用併入本文。進一步的例子包括但不限於：氮芥、乙烯亞胺衍生物、烷基磺酸鹽、亞硝基脲和三氮烯)：尿嘧啶芥 (Aminouracil Mustard® 、 Chlorethaminacil® 、 Demethyldopan® 、 Desmethyldopan®、Haemanthamine®、Nordopan®、Uracil nitrogen mustard®、Uracillost® 、 Uracilmostaza® 、 Uramustin® 、 Uramustine®) 、 氮 甲 鹼 (Mustargen®) 、 環 磷 醯 胺 (Cytoxan® 、 Neosar® 、 Clafen® 、 Endoxan® 、 Procytox® 、 Revimmune™) 、 異 環 磷 醯 胺 (Mitoxana®) 、 美 法 崙 (melphalan)(Alkeran®) 、 苯 丁 酸 氮 芥 (Chlorambucil) (Leukeran®) 、 哌 泊 溴 烷 (pipobroman) (Amedel®、Vercyte®)、三乙烯三聚氰胺 (Hemel®、Hexalen®、Hexastat®)、三乙烯硫代磷胺、替莫唑胺(Temozolomide) (Temodar®)、噻替哌 (thiotepa)(Thioplex®) 、 白 消 安 (busulfan) (Busilvex® 、 Myleran®) 、 卡 莫 司 汀 (carmustine) (BiCNU®) 、 洛 莫 司 汀 (lomustine) (CeeNU®) 、 鏈 脲 佐 菌 素 (streptozocin) (Zanosar®)和達卡巴嗪(Dacarbazine) (DTIC-Dome®)。其他例示性烷化劑包括但不限於：奧沙利鉑 (Oxaliplatin) (Eloxatin®)；替莫唑胺 (Temozolomide)(Temodar®的 Temodal®)；放線菌素(Dactinomycin)(也稱為放線菌素-D，Cosmegen®)；美法崙(Melphalan)(也稱為 L-PAM、L-肌溶素和苯丙胺酸芥末，Alkeran®)；奧曲他明(Altretamine)(也稱為六甲基三聚氰胺(HMM)，Hexalen®) ； 卡 莫 司 汀 (Altretamine)(BiCNU®) ； 苯 達 莫 司 汀 (Bendamustine)(Treanda®)；白消安(Busulfan)(Busulfex®的 Myleran®)；卡鉑 (Carboplatin)(Paraplatin®)；洛莫司汀(Lomustine)(也稱為 CCNU、CeeNU®)；順鉑 (Cisplatin)(也 稱 為 CDDP 、 Platinol® 和 Platinol®-AQ) ； 苯 丁 酸 氮 芥 (Chlorambucil)(Leukeran®) ； 環 磷 醯 胺 (Cytoxan® 和 Neosar®) ； 達 卡 巴 嗪 (Dacarbazine)(也稱為 DTIC、DIC 和咪唑甲醯胺，DTIC-Dome®)；奧曲他明

(Altretamine)(也稱為六甲基三聚氰胺(HMM)，Hexalen®)；異環磷醯胺(Ifex®)；普雷努莫司汀(Prednumustine)；丙卡巴肼(Procarbazine)(Matulane®)；甲氯乙胺(也稱為氮芥、芥子鹼和鹽酸甲氯乙胺，Mustargen®)；鏈脲佐菌素(Streptozocin)(Zanosar®)；噻替哌(Thiotepa)(也稱為硫代磷醯胺、TESPA 和 TSPA、Thioplex®)；環磷醯胺(Endoxan®、Cytoxan®、Neosar®、Procytox®、Revimmune®)；和普癌汰(Bendamustine HCl) (Treanda®)。

【0430】 例示性的鉑基試劑包括但不限於卡鉑(carboplatin)、順鉑(cisplatin)和奧沙利鉑(oxaliplatin)。

【0431】 例示性血管生成抑制劑包括但不限於：A6 (Angstrom Pharmacueticals)、ABT-510 (Abbott Laboratories)、ABT-627 (Atrasentan) (Abbott Laboratories/Xinlay)、ABT-869 (Abbott Laboratories)、阿克替米德(Actimid)(CC4047, Pomalidomide) (Celgene Corporation)、AdGVPEDF.llD (GenVec)、ADH-1 (Exherin) (Adherex Technologies)、AEE788 (Novartis)、AG-013736 (Axitinib) (Pfizer)、AG3340(普立諾司他(Prinomastat)) (Agouron Pharmaceuticals)、AGX1053 (AngioGenex)、AGX51 (AngioGenex)、ALN-VSP (ALN-VSP 02) (Alnylam Pharmaceuticals)、AMG 386 (Amgen)、AMG706 (Amgen)、阿帕替尼(Apatinib) (YN968D1) (Jiangsu Hengrui Medicine)、AP23573 (Ridaforolimus/MK8669) (Ariad Pharmaceuticals)、AQ4N (Novavea)、ARQ 197 (ArQule)、ASA404 (Novartis/Antisoma)、阿替莫德(Atiprimod) (Callisto Pharmaceuticals)、ATN-161 (Attenuon)、AV-412 (Aveo Pharmaceuticals)、AV-951 (Aveo Pharmaceuticals)、癌思停(Avastin)(貝伐單抗(Bevacizumab)) (Genentech)、AZD2171 (西地尼布(Cediranib)/雷思停(Recentin)) (AstraZeneca)、BAY 57-9352 (替拉替尼(Telatinib)) (Bayer)、BEZ235 (Novartis)、BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb)、BMS-582664 (布立伐尼(Brivanib)) (Bristol-Myers Squibb)、BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb)、促鈣三

醇(Calcitriol)、CCI-779 (Torisel) (Wyeth)、CDP-791 (ImClone Systems)、西服通寧 (Ceflatonin) (高三尖山酯鹼 (Homoharringtonine)/HHT) (ChemGenex Therapeutics)、希樂葆 (Celebrex)(Celecoxib) (Pfizer)、CEP-7055 (Cephalon/Sanofi)、CHIR-265 (Chiron Corporation)、NGR-TNF、COL-3 (Metastat) (Collagenex Pharaceuticals)、考布他汀(Combretastatin)(Oxigene)、CP-751、87 1 (Figitumumab) (Pfizer)、CP-547,632 (Pfizer)、CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma)、CT-322 (Angiocept) (Adnexus)、薑黃素(Curcumin)、達肝素(Dalteparin) (Fragmin) (Pfizer)、雙硫崙(Disulfiram) (Antabuse)、E7820 (Eisai Limited)、E7080 (Eisai Limited)、EMD 121974 (Cilengitide) (EMD Pharmaceuticals)、ENMD-1198 (EntreMed)、ENMD-2076 (EntreMed)、恩度(Endostar)(Simcere)、爾必得舒 (Erbitux)(ImClone/Bristol-Myers Squibb)、EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals)、EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals)、GC1008 (Genzyme)、金雀異黃酮(Genistein)、GSK1363089(Foretinib) (GlaxoSmithKline)、GW786034 (Pazopanib) (GlaxoSmithKline)、GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.)、IMC—1121B (Ramucirumab) (ImClone Systems)、IMC-18F1 (ImClone Systems)、IMC-3G3 (ImClone LLC)、INCB007839 (Incyte Corporation)、INGN 241 (Introgen Therapeutics)、艾瑞莎(Iressa)(ZD1839/Gefitinib)、LBH589 (Faridak/Panobinostst) (Novartis)、樂舒晴(Lucentis)(Ranibizumab) (Genentech/Novartis)、LY3 17615 (Enzastaurin) (Eli Lilly and Company)、目可健(Macugen)(Pegaptanib) (Pfizer)、MED1522 (Abegrin) (Medlmmune)、MLN518(Tandutinib) (Millennium)、新華司他(Neovastat)(AE941/Benefin) (Aeterna Zentaris)、蕾莎瓦(Nexavar) (Bayer/Onyx)、NM-3 (Genzyme Corporation)、諾斯卡賓(Noscapine) (Cougar Biotechnology)、NPT2358 (Nereus Pharmaceuticals)、OSI-930 (OSI)、帕洛米得 529 (Palomid 529) (Paloma Pharmaceuticals, Inc.)、潘珊膠囊(Panzem Capsules)(2ME2) (EntreMed)、潘珊 NCD (Panzem NCD) (2ME2) (EntreMed)、PF-02341066 (Pfizer)、PF-04554878 (Pfizer)、PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology)、PKC412

(Novartis)、聚苯醚 E (Polyphenon E)(Green Tea Extract) (Polypheno E International、Inc)、PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals)、PTC299 (PTC Therapeutics)、PTK787 (Vatalanib) (Novartis)、PXD101 (Belinostat) (CuraGen Corporation)、RAD001 (Everolimus) (Novartis)、RAF265 (Novartis)、癌瑞格(Regorafenib)(BAY73-4506) (Bayer)、瑞復美(Revlimid) (Celgene)、利坦(Retaane) (Alcon Research)、SN38 (Liposomal) (Neopharm)、SNS-032 (BMS-387032) (Sunesis)、SOM230(Pasireotide) (Novartis)、角鯊胺(Squalamine) (Genaera)、蘇拉明(Suramin)、索坦(Sutent)(Pfizer)、得舒緩(Tarceva) (Genentech)、TB-403 (Thrombogenics)、坦普斯達丁(Tempostatin)(Collard Biopharmaceuticals)、四硫代鉬酸鹽(Tetrathiomolybdate)(Sigma-Aldrich)、TG100801 (TargeGen)、沙利度胺(Thalidomide)(Celgene Corporation)、低肝酯鈉(Tinzaparin Sodium)、TKI258 (Novartis)、TRC093 (Tracon Pharmaceuticals Inc.)、VEGF Trap (Aflibercept) (Regeneron Pharmaceuticals)、VEGF Trap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals)、維格林(Veglin)(VasGene Therapeutics)、硼替佐米(Bortezomib)(Millennium)、XL184 (Exelixis)、XL647 (Exelixis)、XL784 (Exelixis)、XL820 (Exelixis)、XL999 (Exelixis)、ZD6474 (AstraZeneca)、伏立諾他(Vorinostat) (Merck)、及 ZSTK474。

【0432】 例示性血管內皮生長因子(VEGF)受體抑制劑包括但不限於：貝伐單抗(Bevacizumab) (Avastin®)、阿西替尼(axitinib) (Inlyta®)；布利尼布丙胺酸鹽(Brivanib alaninate) (BMS-582664, (S)-((R)-1-[[4-[(4-氟-2-甲基-17-吲哚-5-基氧基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基氧基]-2-丙基)2-胺基丙酸酯]；索拉非尼(Sorafenib)(Nexavar®)；帕唑帕尼(Pazopanib)(Votrient®)；蘋果酸舒尼替尼(Sunitinib malate)(Sutent®)；西地尼布(Cediranib)(AZD2171，CAS 288383-20-1)；瓦爾加特夫(Vargatef)(BIBF1120, CAS 928326-83-4)；福瑞替尼(Foretinib)(GSK1363089)；泰拉替尼(Telatinib)(BAY57-9352，CAS 332012-40-5)；阿帕替尼(Apatinib)(YN968D1，CAS 811803-05-1)；伊馬替尼(Imatinib)(格列衛®)；波納替尼(Ponatinib)(AP24534，CAS 943319-70-8)；替沃扎尼

(Tivozanib)(AV951，CAS 475108-18-0)；瑞戈非尼(Regorafenib)(BAY73-4506，CAS 755037-03-7)；瓦他拉尼二鹽酸鹽(Vatalanib dihydrochloride)(PTK787，CAS 212141-51-0)；布立伐尼(Brivanib) (BMS-540215, CAS 649735-46-6)；凡德他尼(Vandetanib)(Caprelsa®或 AZD6474)；莫特沙尼二磷酸鹽(Motesanib diphosphate)(AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-二氫-3,3-二甲基-1H-吲哚-6-基)-2-[(4-吡啶基甲基)胺基]-3-吡啶甲醯胺，描述於 PCT 公開號 WO 02/066470 中)；多維替尼雙乳酸(Dovitinib dilactic acid)(TKI258，CAS 852433-84-2)；林法尼(Linfanib)(ABT869，CAS 796967-16-3)；卡博替尼(Cabozantinib)(XL184，CAS 849217-68-1)；來曲替尼(Lestaurtinib)(CAS 111358-88-4)；N-[5-[[[5-(1,1-二甲基乙基)-2-噁唑基]甲基]硫基]-2-噻唑基]-4-哌啶甲醯胺(BMS38703，CAS 345627-80-7)；(3R,4R)-4-胺基-l-((4-((3-甲氧基苯基)胺基)吡咯並[2,1-f] [1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS6905 14)；N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aa,5P,6aa)-八氫-2-甲基環戊二烯[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(BMS6905 14)；N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aa,5P,6aa)-八氫-2-甲基環戊二烯[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647，CAS 781613-23-8)；4-甲基-3-[[1-甲基-6-(3-吡啶基)-1H-吡唑並[3,4-d]嘧啶-4-基]胺基]-N-[3-(三氟甲基)苯基]-苯甲酰胺(BHG712, CAS 940310-85-0)；及阿柏西普(Aflibercept)(Eylea®)。例示性 EGF 路徑抑制劑包括但不限於：酪磷蛋白 46 (tyrphostin 46)、EKB-569、厄洛替尼(erlotinib) (Tarceva®)、吉非替尼(gefitinib) (Iressa®)、爾必得舒(Erbitux)、尼妥珠單抗(nimotuzumab)、拉帕替尼(lapatinib) (Tykerb®)、西妥昔單抗(cetuximab) (anti-EGFR mAb)、經 188Re 標記的尼妥珠單抗(抗 EGFR mAb)，以及特別描述於 WO 97/02266、EP 0 564 409、WO 99/03854、EP 0 520 722、EP 0 566 226、EP 0 787 722、EP 0 837 063、US 5,747,498、WO 98/10767、WO 97/30034、WO 97/49688、WO 97/38983 和 WO 96/33980 中者。

【0433】 例示性 EGFR 抗體包括但不限於：西妥昔單抗(Cetuximab) (Erbitux®)；帕尼單抗(Panitumumab)(Vectibix®)；馬珠單抗(Matuzumab)(EMD-

72000)；曲妥珠單抗(Trastuzumab)(Herceptin®)；尼妥珠單抗(Nimotuzumab)(hR3)；扎魯木單抗(Zalutumumab)；TheraCIM h-R3；MDX0447(CAS 339151-96-1)；和 ch806 (mAb-806，CAS 946414-09-1)。例示性表皮生長因子受體(EGFR)抑制劑包括但不限於：厄洛替尼鹽酸鹽(Erlotinib hydrochloride)(Tarceva®)、吉非尼(Gefitnib) (Iressa®)；N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-7-[[(3“S”)-四氫-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基胺基)-2-丁烯醯胺(Tovok®)；凡德他尼(Vandetanib)(Caprelsa®)；拉帕替尼(Lapatinib)(Tykerb®)；(3R,4R)-4-胺基-1-[[4-[(3-甲氧基苯基)胺基]吡咯並[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基]甲基]哌啶-3-醇(BMS690514)；卡納替尼二鹽酸鹽(Canertinib dihydrochloride)(CI-1033)；6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯乙基]-7H-吡咯並[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788, CAS 497839-62-0)；穆布里替尼(Mubritinib)(TAK165)；佩利替尼(Pelitinib)(EKB569)；阿法替尼(Afatinib)(BIBW2992)；來那替尼(Neratinib)(HKI-272)；N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吲唑-5-基]胺基]-5-甲基吡咯並[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-胺基甲酸,(3S)-3-嗎啉基甲酯(BMS599626)；N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aα,5β,6aα)-八氫-2-甲基環戊[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647，CAS 781613-23-8)；和 4-[4-[[(1R)-1-苯乙基]胺基]-7H-吡咯並[2,3-d]-嘧啶-6-基-酚(PKI 166, CAS 187724-61-4)。

【0434】 例示性 mTOR 抑制劑包括但不限於：雷帕黴素(rapamycin)(Rapamune®)及其類似物和衍生物；SDZ-RAD；特癌適(Temsirolimus)(Torisel®；也稱為 CCI-779)；截克瘤(Ridaforolimus)(正式名稱為德福莫司(deferolimus)，(lR,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羥基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-戊側氧基-ll,36-二氧雜-4-氮雜三環[30.3.1.$0^{4,9}$]三十六-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基環己基二甲基亞膦酸酯，也稱為 AP23573 和 MK8669，且於 PCT 公開號 WO 03/064383 中已有描述)；依維莫司(Everolimus)(Afinitor® 或 RAD001)；雷帕黴素

(Rapamycin)(AY22989，Sirolimus®)；辛匹莫德(Simapimod) (CAS 164301-51-3)；(5-{2,4-雙[(3S)-3-甲基嗎啉-4-基]吡啶並[2,3-d]嘧啶-7-基]-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055)；2-胺基-8-[反式-4-(2-羥基乙氧基)環己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502，CAS 1013101-36-4)；和 2-[1,4-二側氧基-4-[[4-(4-側氧基-8-苯基-4H-1-苯並吡喃-2-基)嗎啉-4-基]甲氧基]丁基]-L-精胺醯甘胺醯基-L-α-天冬胺醯基-絲胺酸(SEQ ID NO: 73)-內鹽(SF1126，CAS 936487-67-1)。

【0435】 例示性免疫調節劑包括，例如：阿夫妥珠單抗(afutuzumab)(可得自Roche®)；培非格司亭(pegfilgrastim)(Neulasta®)；來那度胺(lenalidomide)(CC-5013，Revlimid®)；沙利度胺(thalidomide) (Thalomid®)、阿克替米德(Actimid) (CC4047)；和 IRX-2 (人類細胞因子的混合物，包括介白素 1、介白素 2 和干擾素 g，CAS 951209-71-5，得自 IRX Therapeutics)。例示性蒽環類包括，例如：多柔比星 (doxorubicin)(Adriamycin® 和 Rubex®)；博來黴素(bleomycin)(lenoxane®)；柔紅黴素(daunorubicin)(柔紅黴素鹽酸鹽、柔紅黴素和柔紅黴素鹽酸鹽，Cembidine®)；柔紅黴素脂質體(檸檬酸柔紅黴素脂質體，DaunoXome®)；米托蒽醌 (mitoxantrone)(DHAD，Novantrone®)；表柔比星(epirubicin)(Ellence™)；艾達比星(idambicin)(Idamycin®、Idamycin PFS®)；絲裂黴素 C (Mutamycin®)；格爾德黴素(geldanamycin)；除草霉素(herbimycin)；拉維黴素(ravidomycin)；和去乙醯雷維多黴素。例示性的長春花生物鹼包括，例如：酒石酸長春瑞濱(vinorelbine tartrate)(Navelbine®)、長春新鹼(Vincristine)(Oncovin®)和長春地新(Vindesine) (Eldisine®))；長春鹼(vinblastine)(也稱為硫酸長春鹼、長春花鹼(vincaleukoblastine)和 VLB、Alkaban-AQ®和 Velban®)；和長春瑞濱(vinorelbine)(Navelbine®)。例示性蛋白酶體抑制劑包括硼替佐米(bortezomib)(Velcade®)；卡非唑米(carfilzomib)(PX-171-007，(S)-4-甲基-N-((S)-1-(((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基環氧乙烷-2-基)-1-側氧基戊-2-基)胺基)-1-側氧基-3-苯基丙-2-基)-2-((S)-2-(2-嗎啉基乙醯胺基)-4-苯基丁醯胺基)-戊醯胺)；馬瑞唑米

(marizomib)(NPI-0052)；依薩唑米(ixazomib)檸檬酸鹽(MLN-9708)；迪蘭唑米(delanzomib)(CEP-18770)；及 O-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-絲胺醯基-O-甲基-N-[(1S)-2-[(2R)-2-甲基-2-環氧乙烷基]-2-側氧基-1-(苯基甲基)乙基]-L-絲胺醯胺(ONX-0912)。

【0436】 例示性磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)抑制劑包括但不限於：4-[2-(1H-吲唑-4-基)-6-[[4-(甲基磺醯基)哌嗪-1-基]甲基]噻吩並[3,2-d]嘧啶-4-基]嗎啉(也稱為 GDC 0941 並描述於 PCT 公開號 WO 09/036082 和 WO 09/055730 中)；2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-側氧基-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氫咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(也稱為 BEZ 235 或 NVP-BEZ 235，並描述於 PCT 公開號 WO 06/122806 中)；4-(三氟甲基)-5-(2,6-二嗎啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(也稱為 BKM120 或 NVP-BKM120，描述於 PCT 公開號 WO2007/084786)；特札沙替(Tozasertib)(VX680 或 MK-0457，CAS 639089-54-6)；(5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亞甲基]-2,4-噻唑烷二酮(GSK1059615, CAS 958852-01-2)；(1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙醯氧基)-1-[(二-2-丙烯基胺基)亞甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氫-11-羥基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基環戊[5,6]萘並[1,2-c]吡喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866, CAS 502632-66-8)；和 8-苯基-2-(嗎啉-4-基)-色烯-4-酮(LY294002, CAS 154447-36-6)。

【0437】 例示性的蛋白激酶 B (PKB)或 AKT 抑制劑包括但不限於：8-[4-(1-胺基環丁基)苯基]-9-苯基-1,2,4-三唑並[3,4-f][1,6]萘啶-3(2H)-酮(MK-2206, CAS 1032349-93-1)；哌立福辛(Perifosine) (KRX0401)；4-十二烷基-N-1,3,4-噻二唑-2-基苯磺醯胺(PHT-427，CAS 1191951-57-1)；4-[2-(4-胺基-1,2,5-噁二唑-3-基)-1-乙基-7-[(3S)-3-哌啶基甲氧基]-1H-咪唑並[4,5-c]吡啶-4-基]-2-甲基-3-丁炔-2-醇(GSK690693, CAS 937174-76-0)；8-(1-羥乙基)-2-甲氧基-3-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-6H-二苯並[b,d]吡喃-6-酮(palomid 529、P529 或 SG-00529)；曲西濱(Tricirbine) (6-胺基-4-甲基-8-(P-D-呋喃核糖基)-4H,8H-吡咯並[4,3,2-de]嘧啶並[4,5-c]噠嗪)；(αS)-α-[[[5-(3-甲基-1H-吲唑-5-基)-3-吡啶基]氧基]甲基]-苯乙胺(A674563, CAS 552325-73-2)；4-[(4-氯苯基)甲基]-1-(7H-吡咯並[2,3-d]嘧啶-4-

基)-4-哌啶胺(CCT128930, CAS 885499-61-6)；4-(4-氯苯基)-4-[4-(1H-吡唑-4-基)苯基]-哌啶(AT7867，CAS 857531-00-1)；和特立適(Archexin)(RX-0201, CAS 663232-27-7)。

【0438】 亦可使用抑制鈣依賴性去磷酸酶鈣調磷酸酶(環孢素和 FK506)或抑制 p70S6 激酶，其對於生長因子誘導訊息傳遞(雷帕黴素(rapamycin))相當重要。(Liu 等人，Cell 66:807-815, 1991; Henderson 等人，Immun. 73:316-321, 1991; Bierer 等人，Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)。在另一態樣中，本發明之細胞組成物可與骨髓移植、使用化療試劑(如氟達濱(fludarabin))、外部光束放射療法(XRT)、環磷醯胺及/或抗體(如 OKT3 或 CAMPATH 之抗體)的 T 細胞消融治療，一起投與患者(例如，在之前、同時或之後)。在一態樣中，本發明的細胞組成物在 B 細胞消融治療(例如與 CD20 反應的試劑，例如利妥昔單抗(Rituxan))後投與。例如，在一實施例中，該個體可先接受高劑量化療的標準治療，接著進行周邊血液幹細胞移植。在某些實施例中，在移植之後，該個體接受本發明之經擴增免疫細胞的輸注。在一額外實施例中，擴增的細胞係在手術之前或之後投與。

【0439】 該組合療法可提供協同作用且證明協同作用，亦即，當活性成分一起使用所導致之效果大於分開使用該等化合物的效果總和時，所達到的作用。當活性成分如下述時，可達到協同效應：(1)共同配製且在組合單位劑型中同時投與或遞送時；(2)作為單獨的配方交替或平行遞送時；或(3)藉由一些其他方案。當以交替方式遞送時，可在依序投與或依序遞送化合物時達到協同效應，例如藉由在不同注射器中進行不同注射。一般而言，在交替方式中，各活性成分之有效劑量係依序投與，而在組合療法中，兩種或多於兩種活性成分之有效劑量則一起投與。

【0440】 在一實施例中，在抗癌治療後，將有效量的特異性結合至一或多種本文揭示的抗原或其共軛物的抗體或抗原結合片段，投與於患有腫瘤的個體。在經過足以允許所投與抗體或抗原結合片段或共軛物與相對應癌細胞上表現之

抗原形成免疫複合物的時間之後，偵測該免疫複合物。免疫複合物的存在(或不存在)說明該治療的有效性。舉例而言，與治療前的對照相較，免疫複合物的增加說明該治療無效，而與治療前的對照相較，免疫複合物的減少說明該治療有效。

【0441】 在各實施例中，如本文所述之抗 GCC 抗原結合劑可包括在一治療過程中，其進一步包括向個體投與至少一種額外試劑。在各實施例中，與如本文所述之抗 GCC 抗原結合劑組合投與之額外試劑，可為化療試劑。在各實施例中，與如本文所述之抗原結合劑組合投與之額外試劑，可為抑制發炎之試劑。

【0442】 在一些實施例中，抗 GCC 抗原結合劑為具有人類 GCC 之特異性之單域抗體。在一些實施例中，該抗 GCC 單域抗體可共軛(例如連接)至治療劑(例如化療劑及放射性原子)，以結合至癌細胞、遞送該治療劑至癌細胞，並殺傷表現人類 GCC 之癌細胞。在一些實施例中，抗 GCC 結合劑與治療劑連接。在一些實施例中，治療劑為化療劑、細胞激素、放射性原子、siRNA 或毒素。在一些實施例中，該治療劑為化療劑。在一些實施例中，該試劑為放射性原子。

【0443】 在一些實施例中，該方法可與針對 GCC 相關病症之其他療法結合進行。舉例而言，該組成物可在化學療法之前或之後同時向個體投與。在一些實施例中，該組成物可在採用之治療方法同時、之前或之後向個體投與。

【0444】 在各實施例中，與如本文所述之抗 GCC 結合劑組合投與之額外試劑，可與抗 GCC 結合劑同時投與、在與抗 GCC 結合劑之同一天投與、或與抗 GCC 結合劑同一週內投與。在各實施例中，與如本文所述之抗 GCC 結合劑組合投與之額外試劑，可與抗 GCC 結合劑形成之單一調配物進行投與。在某些實施例中，額外試劑係以與本文所述之抗 GCC 結合劑暫時分離之方式投與，例如，在投與抗 GCC 結合劑之前或之後的一或多個小時、之前或之後的一或多天、之前或之後的一或多週、之前或之後的一或多月。在各實施例中，一或多種額外試劑之投與頻率可與本文所述之抗 GCC 結合劑之投與頻率相同、相似或不同。

【0445】 在組合療法中涵蓋投與兩種如本文所述之不同抗體，及/或包括藉由

複數個調配物及/或投與途徑投與如本文所描述之抗體的治療方案。

【0446】 在一些實施例中，組成物可與一或多種額外治療劑一同配製，例如在個體中治療或預防 GCC 相關病症(例如癌症或自體免疫病症)之額外療法。在個體中用於治療 GCC 相關病症之額外試劑，將視所治療之特定病症而不同，但可包括但不限於：利妥昔單抗(rituximab)、環磷醯胺、多柔比星(doxorubicin)、長春新鹼(vincristine)、強的松(prednisone)、奧斯發醯胺(osfamide)、卡鉑(carboplatin)、依托泊苷(etoposide)、地塞米松(dexamethasone)、阿糖胞苷(cytarabine)、順鉑(cisplatin)、環磷醯胺或氟達拉濱(fludarabine)。

【0447】 本文所描述之組成物可替代或擴增先前或目前投與之療法。舉例而言，當以本文所描述之組成物治療時，一或多種額外活性劑之投與可停止或減少，例如，在投與本文所描述之抗 GCC 結合劑之後，可在較低濃度下投與例如較低位準的參考抗體(其會進行 GCC 結合之相互競爭)。在一些實施例中，可維持先前療法之投與。在一些實施例中，先前療法將維持至組成物之位準達到足以提供治療作用之程度。兩種療法可組合投與。

【0448】 在一些實施例中，可投與該個體可降低或減緩與投與本文所描述之療法或組合(例如，表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)及額外試劑)相關之副作用的試劑。與投與表現 CAR 的細胞相關的副作用包括但不限於 CRS，以及噬血細胞性淋巴組織細胞增多症(HLH)，也稱為巨噬細胞激活化症候群(MAS)。CRS 的症狀包括高燒、噁心、短暫性低血壓、缺氧及類似症狀。因此，本文所描述之方法可包含向個體投與本文所描述之治療，例如表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)，且進一步投與一試劑，以管理由表現 CAR 的細胞治療引起之可溶因子的位準升高。於一實施例中，個體中升高之可溶性因子為 IFN-g、TNFa、IL-2 及 IL-6 中之一或多者。因此，被投與用來治療此副作用之試劑可為可中和這些可溶性因子之一或多者的試劑。此類試劑包括但不限於類固醇、TNFa 抑制劑及 IL-6 抑制劑。TNFa 抑制劑之實例為依那西普(entanercept)。IL-6 抑制劑之實例為托珠單抗(Tocilizumab)。

【0449】 在一實施例中，可向個體投與增進本文所描述之治療活性之試劑，例如表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)。舉例而言，在一實施例中，該試劑可為抑制該抑制性分子的試劑。例如在一些實施例中，額外抑制分子可降低表現 CAR 的細胞建立免疫效應反應之能力。抑制性分子之實例包括 PD1、PD-F1、CTFA4、TIM3、FAG3、VISTA、BTFA、TIGIT、FAIR1、CD160 及 2B4。

【0450】 抑制性分子的抑制，例如藉由在 DNA、RNA 或蛋白質層級上的抑制，可使表現 CAR 的細胞的表現度最佳化。在實施例中，抑制性核酸，例如抑制性核酸如 dsRNA，例如 siRNA 或 shRNA，可用於抑制表現 CAR 的細胞中抑制性分子的表現。在一實施例中，該抑制劑為 shRNA。在一實施例中，該抑制性分子係於表現 CAR 的細胞中被抑制。在這些實施例中，抑制該抑制性分子之表現的 dsRNA 分子，係連接至編碼 CAR 之一成分(例如，所有成分)之核酸。

【0451】 在一些實施例中，抑制信號之抑制劑可為例如結合於該抑制性分子之抗體或抗體片段。例如，該試劑可為與 PD1、PD-L1、PD-L2 或 CTLA4 結合的抗體或抗體片段(例如，易普利單抗(ipilimumab)(也稱為 MDX-010 和 MDX-101，並以 Yervoy®銷售；Bristol -Myers Squibb)；曲美木單抗(Tremelimumab)(IgG2 單株抗體，得自 Pfizer，舊名為替西木單抗(ticilimumab), CP-675,206)。可增強例如表現 CAR 的細胞(例如表現 GCC CAR 的細胞)的活性之試劑可為例如，包含第一域和第二域的融合蛋白，其中第一域是抑制分子或其片段，且第二域是與陽性信號相關的多肽，例如，與陽性信號相關的多肽為 CD28、ICOS 及其片段，例如 CD28 和/或 ICOS 的細胞內信號傳導域。在一實施例中，該融合蛋白由表現該 CAR 之相同細胞表現。在另一實施例中，該融合蛋白由不表現抗 GCC CAR 之細胞(例如，T 細胞)表現。

【0452】 在另一實施例中，該個體接受例如表現 CAR 的細胞之輸注，例如在移植(如同種異體幹細胞移植)之前輸注本揭示之組成物。在一較佳實施例中，表現 CAR 的細胞暫時表現 CAR，例如藉由將編碼 CAR 的 mRNA 進行電穿孔，

藉此在輸注供體幹細胞之前終止 CAR 的表現，以避免移植失敗。

【0453】 某些患者在投與期間或之後，可能會經歷對本揭示之化合物及/或其他抗癌藥物之過敏反應；因此，通常投與抗過敏劑以降低過敏反應的風險。合適的抗過敏劑包括皮質類固醇，例如地塞米松(dexamethasone)(例如，Decadron®)、倍氯米松(beclomethasone)(例如，Beclovent®)、氫化可的松(hydrocortisone)(也稱為可的松、氫化可的松琥珀酸鈉、氫化可的松磷酸鈉，並且以商品名 Ala-Cort®出售)、磷酸氫化可的松、Solu-Cortef®、Hydrocort Acetate®的 Lanacort®)、潑尼松龍(prednisolone)(以商品名 Delta-Cortel®、Orapred®、Pediapred®的 Prelone®出售)、潑尼松(prednisone)(以商品名 Deltasone®、Liquid Red®、Meticorten®和 Orasone®出售)、甲基潑尼松龍(methylprednisolone)(也稱為 6-甲基潑尼松龍、醋酸甲基潑尼松龍、甲基潑尼松龍琥珀酸鈉，以商品名 Duralone®、Medralon®、Medrol®、M-Prednisol®和 Solu-Medrol®出售)；抗組胺藥，例如苯海拉明(diphenhydramine)(例如 Benadryl®)、羥嗪和賽庚啶(cyproheptadine)；和支氣管擴張劑，例如 β-腎上腺素系受體促效劑、沙丁胺醇(albuterol)(例如 Proventil®)和特布他林(terbutaline)(Brethine®)。某些患者在投與本揭示之化合物及/或其他抗癌藥物期間及之後可能出現噁心；因此，抗嘔吐劑被用於預防噁心(上胃)及嘔吐。適合的抗嘔吐藥物包括阿瑞匹坦(aprepitant) (Emend®)、昂丹司瓊(ondansetron) (Zofran®)、鹽酸格拉司瓊(granisetron HCl) (Kytril®)、勞拉西泮(lorazepam) (Ativan® 地塞米松(dexamethasone) (Decadron®)、丙氯拉嗪(prochlorperazine) (Compazine®)、卡索匹坦(casopitant) (Rezonic®的 Zunrisa®)及其組合。

【0454】 通常會開立藥物以減輕治療期間所經歷的疼痛，讓患者更加舒適。經常使用常見的非處方止痛藥，例如 Tylenol®。然而，鴉片類鎮痛藥，例如氫可酮/撲熱息痛(hydrocodone/paracetamol)或氫可酮/對乙醯胺基酚(hydrocodone/acetaminophen)(例如 Vicodin®)、嗎啡(morphine)(例如 Astramorph®或 Avinza®)、羥考酮(oxycodone)(例如 OxyContin®或 Percocet®)、

鹽酸羥嗎啡酮(oxymorphone hydrochloride)(Opana®) 和芬太尼(fentanyl)(例如，Duragesic®)，也可用於中度或重度疼痛。

【0455】 為了保護正常細胞免於治療毒性，並限制器官毒性，可使用細胞保護劑例如神經保護劑、自由基清除劑、心臟保護劑、蒽環類外滲中和劑、營養物質及類似物，作為輔助療法。適合的細胞保護劑包括胺磷汀(Amifostine)(Ethyol®)、麩胺醯胺、地美思納(dimesna)(Tavocept®)、美思納(mesna)(Mesnex®)、右雷佐生(dexrazoxane)(Zinecard® 或 Totect®)、沙利普登(xaliproden) (Xaprila®)和亞葉酸鈣(leucovorin)(也稱為亞葉酸鈣、檸檬酸鈣因子和亞葉酸)。

【0456】 以代碼、通用名或商品名辨識之活性化合物的結構，係取自標準藥典實際版本「The Merck Index」或資料庫，例如國際專利(例如 IMS World Publications)。上述化合物可與本發明之化合物組合使用，可如本技術領域中所述製備及投與，如在上文所引用之文獻中所述。

【0457】 在一實施例中，本發明提供一種醫藥組成物，其包含至少一本發明之治療劑(例如，本發明的治療劑)或其醫藥學上可接受的鹽、以及適合一起投與人類或動物個體之醫藥學上可接受的載體，不論是單獨或與其他抗癌劑一起使用。

【0458】 在一實施例中，本發明提供治療患有細胞增殖性疾病(例如癌症)的人類或動物個體的方法。本發明提供治療需要此類治療的人類或動物個體的方法，包括向該個體投與治療有效量之本發明的治療劑或其醫藥學上可接受的鹽，不論是單獨或與其他抗癌劑一起投與。

【0459】 特別地，組成物將配製為組合治療劑或分開投與。在組合治療中，本發明的化合物和其他抗癌劑可同步、同時或依序投與，沒有特定的時間限制，其中此種投與提供該二化合物在患者體內的治療有效位準。

【0460】 在一些實施例中，本發明的化合物和其他抗癌劑通常藉由輸注或口服、以任何順序依次投與。投藥方案可根據疾病的階段、患者的身體健康狀況、

個別藥物的安全性、個別藥物的耐受性、以及主治醫師和執業醫師熟知投與該組合的其他標準，而有所不同。本發明之治療劑(例如 GCC CAR)及其他抗癌劑可彼此相隔數分鐘、數小時、數日或甚至數周投與，取決於用於治療之特定循環。此外，該循環可包括在治療循環中，其中一種藥物比另一種藥物更常被投與，且在每次投與該藥物時以不同劑量投與。

【0461】 本發明之治療劑(例如，GCC CAR)亦可有利地用於與已知的治療過程(例如，投與激素或尤其是放射線)組合。本發明之化合物可特別作為放射線增敏劑，特別是用於治療對放射療法表現出不良敏感性的腫瘤。

【0462】 在實施例中，可投與該個體可降低或減緩與投與表現 CAR 的細胞相關之副作用的試劑。與投與表現 CAR 的細胞相關的副作用包括但不限於 CRS，以及噬血細胞性淋巴組織細胞增多症(HLH)，也稱為巨噬細胞激活化症候群(MAS)。

【0463】 因此，本文所描述之方法可包含向個體投與本文所描述之表現 CAR 的細胞，且進一步投與一或多種試劑，以管理由經表現 CAR 的細胞治療導致之可溶性因子的升高位準。在一實施例中，該個體中升高之可溶性因子為 IFN-g、TNFa、IL-2 及 IL-6 中之一或多者。在一實施例中，該個體中升高的因子為 IL-1、GMCSF、IL-10、IL-8、IL-5 及趨化因子(fraktalkine)之一或多者。因此，被投與用來治療此副作用之試劑可為可中和這些可溶性因子之一或多者的試劑。

【0464】 在一實施例中，中和這些可溶性形式之一或多者的試劑為一抗體或其抗原結合片段。此類試劑之實例包括但不限於類固醇(例如皮質類固醇)、TNFa 抑制劑及 IL-6 抑制劑。TNFa 抑制劑之一實例為抗 TNFa 抗體分子，如英夫利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、賽妥珠單抗聚乙二醇(certolizumab pegol)和戈利木單抗(golimumab)。TNFa 抑制劑之另一實例為一融合蛋白，如依那西普(entanercept)。TNFa 的小分子抑制劑包括但不限於：黃嘌呤衍生物(例如己酮可可鹼(pentoxifylline))及安非他酮(bupropion)。IL-6 抑制劑之實例為抗-IL-6 抗體分子，例如托珠單抗(Tocilizumab) (toe)、沙利尤單抗

(sarilumab)、艾司利單抗(elsilimomab)、CNTO 328、ALD518/BMS-945429、CNTO 136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301 及 FM101。在一實施例中，抗-IL-6 抗體分子為托珠單抗(Tocilizumab)。基於 IL-1R 之抑制劑的實例為阿那白滯素(anakinra)。

【0465】 在一些實施例中，向個體投與皮質類固醇，諸如，例如，甲基普德尼松(methylprednisolone)、氫皮質酮(hydrocortisone)等。在一些實施例中，向個體投與血管加壓劑，例如正腎上腺素、多巴胺、苯腺、腎上腺素、升壓素、或其組合。

【0466】 在一實施例中，可投與該個體退熱劑。在一實施例中，可投與該個體止痛劑。

【0467】 在一實施例中，可進一步向個體投與提高表現 CAR 的細胞之活性或適合性之試劑。例如，在一實施例中，該試劑可為抑制調控或調節(例如，抑制)T 細胞功能之分子的試劑。在一些實施例中，該調控或調節 T 細胞功能之分子為抑制性分子。抑制性分子，例如計劃性死亡 1 (PD-1)或 PD-1 配位體(PD-L1)，在一些實施例中，可降低表現 CAR 的細胞建立免疫效應反應之能力。抑制性分子之實例包括 PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM (例如，CEACAM-1、CEACAM-3 及/或 CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14 或 CD270)、KIR、A2aR、第 1 類 MHC、第 2 類 MHC、GAL9 和腺苷。調控或調節(例如，抑制)T 細胞功能(例如，藉由在 DNA、RNA 或蛋白質層級抑制)之分子的抑制，可使表現 CAR 的細胞之表現度最佳化。在實施例中，試劑例如抑制性核酸，例如，抑制性核酸如 dsRNA，例如 siRNA 或 shRNA、成簇的規則間隔短回文重複序列(CRISPR)、轉錄激活因子樣效應核酸酶(TALEN)、或鋅指核酸內切酶(ZFN)，如本文所述，可用於抑制表現 CAR 的細胞中抑制性分子的表現。在一實施例中，該抑制劑為 shRNA。於一實施例中，調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之試劑係在表現 CAR 的細胞中被抑制。在這

些實施例中，抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現的 dsRNA 分子，係與編碼 CAR 之一成分(例如所有成分)的核酸連接。

【0468】 在一實施例中，該編碼調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現的 dsRNA 分子之核酸分子，係可操作地連接至一啟動子，例如 HI-或 U6-衍生的啟動子，使得抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現的 dsRNA 分子可被表現，例如，在表現CAR的細胞中被表現。請參見例如，Tiscomia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA," 第 3 章，in Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (Friedmann 及 Rossi 編)。Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR 編，(2002) Science 296: 550-553; Miyagishi M 等人，(2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500。

【0469】 在一實施例中，編碼一 dsRNA 分子(其抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現)的核酸分子，係存在於包含該編碼 CAR 之一成分(例如所有成分)的核酸之相同載體(例如，慢病毒載體)上。在此類實施例中，編碼一 dsRNA 分子(其抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現)的核酸分子，係位於載體(例如，慢病毒載體)上相對於該編碼 CAR 之一成分(例如所有成分)的核酸之 5'-或 3'-端。編碼一 dsRNA 分子(其抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現)的核酸分子，可在與編碼 CAR 之一成分(例如所有成分)的核酸相同或不同方向上進行轉譯。於一實施例中，編碼一 dsRNA 分子(其抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現)的核酸分子，係存在於包含編碼 CAR 之一成分(例如所有成分)的核酸之載體以外的載體上。於一實施例中，編碼一 dsRNA 分子(其抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現)的核酸分子，係於表現 CAR 的細胞中暫時表現。於一實施例中，編碼一 dsRNA 分子(其抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現)的核酸分子，係穩定整合至表現 CAR 的細胞之基因組中。提供用於表現 CAR 之一成分(例如所有成分)與 dsRNA 分子(其抑制調控或調節(例如抑制)T 細胞功能之分子表現)的例示性載體的配置，

係提供於例如，於 2014 年 12 月 19 日所提交之國際公開案 WO20 15/090230 之圖 47 中，其經由引用併入本文。

【0470】 在實施例中，本文所述的療法，例如表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)，係與抗癲癇劑例如乙醯唑胺(acetazolamide)、比伐西坦(bivaracetam)、卡馬西平(carbamazepine)、氯巴佔(clobazam)、氯硝西泮(clonazepam)、醋酸艾司利卡西平(eslicarbazepine acetate)、乙琥胺(ethosuximide)、加巴噴丁(gabapentin)、拉考沙胺(lacosamide)、拉莫三嗪(lamotrigine)、左乙拉西坦(levetiracetam)、奧卡西平(oxcarbazepine)、吡崙帕奈(perampanel)、苯巴比妥(phenobarbital)、苯妥英(phenytoin)、吡拉西坦(piracetam)、普瑞巴林(pregabalin)、撲米酮(primidone)、盧地那胺(rudinamide)、丙戊酸鈉、司替戊醇(stiripentol)、噻加賓(tiagabine)、托吡酯(topiramate)、丙戊酸、氨己烯酸(vigabatrin)、唑尼沙胺(zonisamide)組合投與。請參見，Weller等人，Lancet 13.9 (2012):e375-e382。在實施例中，抗癲癇劑在本文所描述之治療(例如表現 CAR 的細胞(例如表現 GCC CAR 的細胞))之前，以有效防止癲癇之量投與。在實施例中，抗癲癇劑之投與視情況在投與本文所描述之治療(例如表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)全程與之後持續。在實施例中，本文所描述之治療，例如表現 CAR 的細胞(例如表現 GCC CAR 的細胞)，可與抗癲癇劑及放射線組合治療使用。

【0471】 細胞激素釋放症候群(CRS)

【0472】 細胞激素釋放症候群(CRS)是一種可能危及生命的細胞激素相關毒性，可能由於癌症免疫療法(例如癌症抗體療法或 T 細胞免疫療法(例如 CAR T 細胞))而發生。CRS 是由高位準的免疫活化引起的，當大量淋巴細胞及/或骨髓細胞在活化時釋放發炎性細胞激素時。CRS 的嚴重程度和症狀的出現時間，可能根據免疫細胞活化的程度、投與的治療類型及/或個體的腫瘤負荷程度而有所不同。在治療癌症的 T 細胞治療中，症狀通常在投與 T 細胞療法後數天至數星期發作，例如當體內 T 細胞擴增達到高峰時。請參見例如 Lee 等人 Blood.

124.2(2014): 188-95。

【0473】 CRS 的症狀可能包括神經毒性、彌散性血管內凝血、心臟功能不全、成人呼吸窘迫症候群、腎功能衰竭及/或肝功能衰竭。例如，CRS 的症狀包括高燒、噁心、短暫性低血壓、缺氧及類似症狀。CRS 可包括臨床徵象和症狀，例如發燒、疲勞、厭食、肌肉痛、關節痛、噁心、嘔吐和頭痛。CRS 可包括臨床皮膚徵象和症狀，例如紅疹。CRS 可包括臨床胃腸道徵象和症狀，例如噁心、嘔吐和腹瀉。CRS 可包括臨床呼吸徵象與症狀，例如呼吸急促與低氧血症。CRS 可包括臨床心血管徵象與症狀，例如心搏過速、脈搏壓變寬、低血壓、心搏輸出增加(早期)，以及潛在性心臟輸出降低(晚期)。CRS 可包括臨床凝血徵象和症狀，例如 d-二聚體升高、低纖維蛋白原血症伴隨或未伴隨出血。CRS 可包括臨床腎臟徵象和症狀，例如高氮血症。CRS 可包括臨床肝臟徵象和症狀，例如轉胺炎和高膽紅素血症。CRS 包括臨床神經系統體徵象和症狀，例如頭痛、精神狀態改變、意識模糊、譫妄、找詞困難或明顯失語、幻覺、震顫、動幅障、步態改變和癲癇發作。

【0474】 IL-6 被認為是 CRS 毒性的介導物。參見，例如，id。高 IL-6 濃度可引發促發炎性 IL-6 信號傳導連鎖反應，而引起一或多種 CRS 症狀。在一些案例中，C-反應蛋白(CRP)(一種由肝臟製造的生物分子，例如，反應於 IL-6)的濃度可用於 IL-6 活性的測量。在一些案例中，在 CRS 期間，CRP 的濃度可能會增加數倍(例如數個 log)。CRP 濃度可使用本文所述之方法，及/或本領域可用的標準方法測量。

【0475】 CRS 評級

【0476】 在一些實施例中，CRS 可如下評定為 1 至 5 級。第 1-3 級是低於嚴重的 CRS。第 4-5 級是嚴重的 CRS。對於第 1 級 CRS，只需要症狀性治療(例如噁心、發燒、疲倦、肌痛、不適、頭痛)，且症狀並非危及生命。對於第 2 級 CRS，症狀需要中度介入，且一般對於中度介入有反應。患有第 2 級 CRS 的個體會發展出對流體或一種低劑量血管加壓劑有反應的低血壓；或者發展出等級

2 之器官毒性或輕度呼吸症狀，其對於低流量氧氣(<40%氧氣)有反應。

【0477】 在第 3 級 CRS 個體中，低血壓一般無法透過流體療法或一種低劑量血管加壓劑而逆轉。這些個體一般需要超過低流量的氧氣，且具有等級 3 之器官毒性(例如腎臟或心臟功能不全或凝血病變)及/或等級 4 之轉胺炎。第 3 級 CRS 個體需要更積極的介入，例如：40%或以上的氧氣、高劑量的血管加壓劑，及/或多種血管加壓劑。第 4 級的 CRS 個體會立即出現危及生命的症狀，包括等級 4 的器官毒性或需要機械通氣。第 4 級 CRS 個體通常不會有轉胺炎。在第 5 級 CRS 個體中，該毒性會造成死亡 例如，在此以表 9 提供 CRS 評級之條件。除非另外指明，否則如本文所用之 CRS 係指根據表 9 之 CRS 標準。

表 9. CRS 評級

Grl	僅有支持性照護
Gr2	IV 療法+/- 住院。
Gr3	需要 IV 輸液或低劑量血管活性劑或需要氧氣、CPAP 或 BIPAP 的低氧血症的低血壓。
Gr4	需要高劑量血管活性劑的低血壓或需要機械性的低血氧
Gr5	死亡

CRS 療法

【0478】 用於 CRS 的療法包括 IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如托珠單抗(Tocilizumab)或西妥昔單抗(siltuximab))、sgpl30 阻斷劑、血管活化藥物、皮質類固醇、免疫抑制劑和機械通氣。用於 CRS 之例示性療法描述於國際申請案號 W02014011984 中，其經由引用併入本文。

【0479】 托珠單抗(Tocilizumab)是一種人源化免疫球蛋白 Glkappa 抗人類 IL-6R 單株抗體。參見，例如，id。托珠單抗(Tocilizumab)阻斷 IL-6 與可溶性及膜結合 IL-6 受體(IL-6R)的結合，因此抑制古典和反向-IL-6 訊號傳遞。在實施例

中，托珠單抗(Tocilizumab)以約 4-12 mg/kg 之劑量進行投與，例如成人約 4-8 mg/kg、及兒童個體約 8-12 mg/kg，例如歷時 1 小時。在一些實施例中，CRS 治療劑為 IL-6 信號傳導抑制劑，例如 IL-6 或 IL-6 受體之抑制劑。在一實施例中，該抑制劑為抗-IL-6 抗體，例如抗-IL-6 嵌合單株抗體，如西妥昔單抗(siltuximab)。在其他實施例中，該抑制劑包含可阻斷 IL-6 信號傳導之可溶性 gp130 或其片段。在一些實施例中，該 sgp130 或其片段與異源域(例如，Lc 域)融合，例如為 gp130-Lc 融合蛋白，諸如 LE301。在實施例中，IL-6 信號傳導之抑制劑包含抗體，例如針對 IL-6 受體之抗體，如沙利魯單抗(sarilumab)、奧基珠單抗(olokizumab)(CDP6038)、艾司利莫單抗(elsilimomab)、辛庫單抗(simkumab)(CNTO 136)、ALD518/BMS-945429、ARGX-109 或 LM101。在一些實施例中，該 IL-6 信號傳導之抑制劑包含小分子，例如 CPST2364。

【0480】 例示性的血管活化藥物包括但不限於：血管緊張素-11、內皮素-1、α-腎上腺素促效劑、rostanoids、磷酸二酯酶抑制劑、內皮素拮抗劑、正性肌力藥（例如，腎上腺素、多巴酚丁胺、異丙腎上腺素、麻黃鹼）、血管加壓劑（例如，去甲腎上腺素、升壓素、間苯二酚、升壓素、亞甲藍）、擴張劑（如米力農(milrinone)、左西孟旦(levosimendan)）和多巴胺。例示性的血管加壓劑包括但不限於正腎上腺素、多巴胺、脫羥腎上腺素、腎上腺素和升壓素。在一些實施例中，高劑量血管加壓劑包括以下中的一或多種：>20 ug/min 的正腎上腺素單一療法、>10 ug/kg/min 的多巴胺單一療法、>200 ug/min 的脫羥腎上腺素單一療法、及/或>10 ug/min 的腎上腺素單一療法。在一些實施例中，如果個體使用升壓素，則高劑量血管加壓劑包括等效於＞10 ug/min 之升壓素+正腎上腺素，其中該正腎上腺素等效劑量=[正腎上腺素(ug/min)] + [多巴胺(ug/kg/min) / 2] + [腎上腺素(ug/min)]+[脫羥腎上腺素 (ug/min)/10]。在一些實施例中，若個體正接受血管加壓劑(非升壓素)，則高劑量血管加壓劑包括等效於>20 ug/min 之正腎上腺素，其中正腎上腺素等效劑量 = [正腎上腺素(ug/min)] + [多巴胺(ug/kg/min)/ 2] + [腎上腺素(ug/min)] + [脫羥腎上腺素 (ug/min)/10]。參見例如，

Id。

【0481】 在一些實施例中，低劑量血管加壓劑為投與劑量低於以上列出用於高劑量血管加壓劑之一或多種劑量的血管加壓劑。例示性皮質類固醇包括但不限於：地塞米松(dexamethasone)、氫化可的松(hydrocortisone)和甲基強的松龍(methylprednisolone)。在實施例中，地塞米松(dexamethasone)的使用劑量為 0.5 mg/kg。在實施例中，地塞米松(dexamethasone)的最大使用劑量為 10 mg/劑。在實施例中，甲基普德尼松(methylprednisolone)的使用劑量為 2 mg/kg/日。

【0482】 例示性免疫抑制劑包括但不限於：TNFa 抑制劑或 IL-1 抑制劑。在實施例中，TNFa 抑制劑包含抗 TNFa 抗體，例如單株抗體，例如英夫利昔單抗(infliximab)。在實施例中，TNFa 抑制劑包含可溶性 TNFa 受體(例如依那西普(etanercept))。在實施例中，IL-1 或 IL-1R 抑制劑包含阿那白滯素(anakinra)。

【0483】 在一些實施例中，具有發展嚴重 CRS 風險之個體被投與抗 IFN-γ 或抗-sIF2Ra 療法，例如引導對抗 IFN-γ 或 sIF2Ra 之抗體分子。

【0484】 在實施例中，對於已接受如博納吐單抗(Blinatumomab)之治療性抗體分子，且具有 CRS 或具有發展 CRS 之風險的個體，該治療性抗體分子以較低劑量及/或較低頻率投與，或暫停投與治療性抗體分子。

【0485】 在實施例中，患有 CRS 或具有發展 CRS 風險的個體係以退熱藥物(如對乙醯胺基酚)治療。在實施例中，對本文的個體投與或提供一或多種本文所述的 CRS 療法，例如 IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如托珠單抗(tocilizumab))、血管活化藥物、皮質類固醇、免疫抑制劑或機械通氣之一或多者，以任一組合，例如與本文所述之表現 CAR 的細胞組合。

【0486】 在實施例中，向具有發展 CRS 之風險(例如嚴重 CRS)(例如，經確認具有發展為嚴重 CRS 之高風險狀態之個體)的個體，投與一或多種本文所述的 CRS 療法，例如 IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如托珠單抗(tocilizumab))、血管活化藥物、皮質類固醇、免疫抑制劑或機械通氣之一或多者，以任一組合，例如與本文所述之表現 CAR 的細胞組合。

【0487】 在實施例中，本文個體(例如具有發展為嚴重 CRS 之風險之個體或確定具有發展為嚴重 CRS 之風險之個體)轉移至加護病房中。在一些實施例中，係監測此述之個體(例如具有發展為嚴重 CRS 之風險之個體或確定具有發展為嚴重 CRS 之風險之個體)與 CRS 相關的一或多種症狀或病況，例如發燒、心率加快、凝血障礙、MODS（多器官功能障礙症候群）、心血管功能障礙、分佈性休克、心肌病變、肝功能障礙、腎功能障礙、腦病、臨床癲癇發作、呼吸衰竭或心搏過速。在一些實施例中，本文方法包含對與 CRS 相關的症狀或病況之一者投與治療。例如，在實施例中，例如若個體出現凝血障礙，則該方法包括投與冷沉澱物。在一些實施例中，例如若個體發展出心血管功能障礙，則該方法包含投與血管活化劑輸注支持療法。在一些實施例中，例如若個體發展出分佈性休克，則該方法包含投與 α-促效劑療法。在一些實施例中，例如若個體發展心肌病變，該方法包含投與米力農(milrinone)療法。在一些實施例中，例如若個體出現呼吸衰竭，則該方法包括執行機械通氣(例如，侵入性機械通氣或非侵入性機械通氣)。在一些實施例中，例如若個體發展出休克，則該方法包含投與類晶體及/或膠體流體。在實施例中，該表現 CAR 的細胞在投與本文所述之 CRS 之一或多種療法(例如 IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如托珠單抗(tocilizumab))、血管活化藥物、皮質類固醇、免疫抑制劑或機械通氣之一或多者)之前、同時或之後投與。在實施例中，該表現 CAR 的細胞在本文所述之 CRS 之一或多種療法(例如 IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如托珠單抗(tocilizumab))、血管活化藥物、皮質類固醇、免疫抑制劑或機械通氣之一或多者)投與後 2 周內(例如，在 2 周或 1 周內，或在 14 天內，例如，在 14、13、12、11、10、9、8、7、5、6、4、3、2 或 1 天或更短時間內)投與。在實施例中，該表現 CAR 的細胞在本文所述之 CRS 之一或多種療法(例如 IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如托珠單抗(tocilizumab))、血管活化藥物、皮質類固醇、免疫抑制劑或機械通氣之一或多者)投與之前或之後，投與至少 1 天（例如，至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、

20天、1週、2週、3週、4週、1個月、2個月、3個月、3個月或更長時間）。

【0488】 在實施例中，向此述之個體((例如具有發展為嚴重 CRS 之風險之個體或確定具有發展為嚴重 CRS 之風險之個體)投與單次劑量之 IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如，托珠單抗(tocilizumab))。在實施例中，向該個體投與多次劑量(例如 2、3、4、5、6 或更多次劑量)之 IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如，托珠單抗(tocilizumab))。

【0489】 在實施例中，低或無 CRS(例如嚴重 CRS)風險之個體(例如，經確認為具有發展為嚴重 CRS 之低風險狀態之個體)不投與本文所描述之 CRS 之一療法，例如，IL-6 抑制劑或 IL-6 受體(IL-6R)抑制劑(例如托珠單抗(tocilizumab))、血管活化藥物、皮質類固醇、免疫抑制劑或機械通氣之一或多者。

【0490】 在一些實施例中，藉由本文所揭示之方法治療之個體具有低嚴重性之 CRS，例如，第 1 級、第 2 級或第 3 級。

【0491】 在實施例中，表現 CAR 的活細胞係以遞增劑量進行投與。在實施例中，第二劑量大於第一劑量，例如，大於 10%、20%、30%或 50%。在實施例中，第二劑量為第一劑量之兩倍、三倍、四倍或五倍。在實施例中，第三劑量大於第二劑量，例如，大於 10%、20%、30%或 50%。在實施例中，該第三劑量為第二劑量之兩倍、三倍、四倍或五倍。

【0492】 在某些實施例中，該方法包括下列 a)-h)之一、二、三、四、五、六、七者或全部：

【0493】 a)在第一劑量中所投與之表現 CAR 的活細胞數目不超過在第二劑量中所投與之表現 CAR 的活細胞數目的 1/3；

【0494】 b)在第一劑量中所投與之表現 CAR 的活細胞數目不超過所投與之表現 CAR 的活細胞總數的 1/X，其中 X 為 2、3、4、5、6、7、8、9,、10、15、20、30、40 或 50；

【0495】 c)在第一劑量中所投與之表現 CAR 的活細胞數目不超過 1 x 10^7、2 x 10^7、3 x 10^7、4 x 10^7、5 x 10^7、6 x 10^7、7 x 10^7、8 x 10^7、9 x 10^7、1 x 10^8、

1.75 x 10^8、2 x 10^8、3 x 10^8、4 x 10^8或 5 x 10^8個表現 CAR 的活細胞，且第二劑量大於第一劑量；

【0496】 d)在第二劑量中所投與之表現 CAR 的活細胞數目不超過在第三劑量中所投與之表現 CAR 的活細胞數目的 1/2；

【0497】 e)在第二劑量中所投與之表現 CAR 的活細胞數目不超過所投與之表現 CAR 的活細胞總數的 1/Y，其中 Y 為 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40 或 50；

【0498】 f)在第二劑量中所投與之表現 CAR 的活細胞數目不超過 1 x 10^7、2 x 10^7、3 x 10^7、4 x 10^7、5 x 10^7、6 x 107、7 x 10^7、8 x 10^7、9 x 10^7、1 x 10^8、1.75 x 10^8、2 x 10^8、3 x 10^8、4 x 10^8或 5 x 10^8個表現 CAR 的活細胞，且第三劑量大於第二劑量；

【0499】 h)該第一、第二及視情況第三劑量之投與劑量及期間係經選擇，使得該個體經歷不大於等級 4、3、2、或 1 之 CRS。

【0500】 在實施例中，總劑量為約 5 x 10^8個表現 CAR 的活細胞。在實施例中，總劑量為約 5 x 10^7 - 5 x 10^8個表現 CAR 的活細胞。在實施例中，第一劑量為約 5 x 10^7個(例如，± 10%、20%或 30%)表現 CAR 的活細胞，第二劑量為約 1.5 x 10^8個(例如，± 10%、20%或 30%)表現 CAR 的活細胞，且第三劑量為約 3 x 10^8個(例如，± 10%、20%或 30%)表現 CAR 的活細胞。

【0501】 在實施例中，在接受劑量之後，例如在接受第一劑量、第二劑量及/或第三劑量之後，對個體進行 CRS 評估。

【0502】 在實施例中，該個體接受 CRS 治療，例如托珠單抗(tocilizumab)、皮質類固醇、依那西普(etanercept)或西妥昔單抗(siltuximab)。在實施例中，該 CRS 治療在該包含 CAR 分子之第一劑量細胞投與之前或之後投與。在實施例中，該 CRS 治療在該包含 CAR 分子之第二劑量細胞投與之前或之後投與。在實施例中，該 CRS 治療在該包含 CAR 分子之第三劑量細胞投與之前或之後投與。在實施例中，該 CRS 治療在該包含 CAR 分子之細胞之第一及第二劑量之

間投與，及/或在該包含 CAR 分子之細胞之第二及第三劑量之間投與。

【0503】 在實施例中，在第一劑量之後具有 CRS 等級如第 1、2、3 或 4 級之個體中，在第一劑量之後至少 2、3、4 或 5 天投與第二劑量。在實施例中，在第二劑量之後具有 CRS 等級如第 1、2、3 或 4 級之個體中，在第二劑量之後至少 2、3、4 或 5 天投與第三劑量。在實施例中，對於在第一劑量後具有 CRS 之個體，該第二劑量之表現 CAR 的細胞的投與時間延後，相對於不具 CRS 之個體之第二劑量投與。在實施例中，對於在第二劑量後具有 CRS 之個體，該第三劑量之表現 CAR 的細胞的投與時間延後，相對於不具 CRS 之個體之第三劑量投與。

【0504】 在實施例中，在投與第一劑量之前，該個體患有具有高疾病負荷之癌症。在實施例中，該個體之骨髓芽細胞位準為至少 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或 50%，例如至少 5%。在實施例中，個體患有第 I、II、III 或 IV 期之癌症。在實施例中，個體之單一腫瘤或複數個腫瘤之腫瘤質量為至少 1、2、5、10、20、50、100、200、500 或 1000 g。

【0505】 在一些實施例中，該患者患有癌症(如大腸直腸癌)。在一些實施例中，該癌症為與如本文所述之 GCC 表現相關之疾病。在實施例中，該 CAR 分子為如本文所述之 CAR 分子。

【0506】 在一態樣中，表現 CAR 的細胞(例如，表現 GCC CAR 的細胞)係使用慢病毒載體(如慢病毒)產生。以這方式所產生之表現 CAR 的細胞將能穩定表現 CAR。衍生自逆轉錄病毒(如慢病毒)的載體為達成長期基因轉移的合適工具，因為它們允許轉基因長期穩定整合並在子代細胞中繁殖。慢病毒載體比衍生自癌-逆轉錄病毒(例如鼠類白血病病毒)的載體具有額外的優勢，因為它們可以轉導非增殖細胞(例如肝細胞)。它們亦具有低免疫原性的額外優勢。逆轉錄病毒載體亦可為，例如，γ 逆轉錄病毒載體。γ 逆轉錄病毒載體可包含例如啟動子、包裝信號(y)、引子結合位點(PBS)、一或多個(例如，兩個)長末端重複(LTR)、

及有興趣之轉基因，例如編碼 CAR 之基因。γ 逆轉錄病毒載體可缺乏病毒結構性基因，例如 gag、pol 及 env。例示性的 γ 逆轉錄病毒載體包括鼠類白血病病毒(MLV)、脾-病灶形成病毒(SFFV)及骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)，及衍生自該病毒之載體。其他 γ 逆轉錄病毒載體描述於例如 Tobias Maetzig 等人，“Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application” Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713。

【0507】 在一態樣中，在轉導之後 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 天之表現 CAR 的細胞會暫時表現 CAR 載體。CAR 之暫時表現可被 RNA CAR 載體遞送影響。在一態樣中，該 CAR RNA 藉由電穿孔轉導至 T 細胞中。

【0508】 使用暫時表現之細胞(尤其是具有鼠類 scFv 之表現 CAR 的細胞)治療患者時，可能出現之潛在問題為多次治療後之過敏反應。不受限於此理論，一般相信這種過敏反應可能是由於患者發展出體液抗-CAR 反應(即具有抗 IgE 同種型之抗 CAR 抗體)所引起。一般認為，當抗原暴露中斷 10 到 14 天時，患者的抗體產生細胞會經歷從 IgG 同種型（不會引起過敏反應）到 IgE 同種型的類別轉換。

【0509】 如果患者在暫時 CAR 治療過程中產生抗 CAR 抗體反應的風險很高（例如由 RNA 轉導產生者），則表現 CAR 的細胞之輸注中斷不應持續超過 10 到 14 天。

組成物

【0510】 本文提供用於基因療法、免疫療法及/或細胞療法的組成物，其包括一或多種揭示之 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、抗體、抗原結合片段、共軛物、CAR 或表現 CAR 的 T 細胞(其特異性結合至本文揭示的一或多種抗原)，於一載體(例如藥學上可接受的載體)中。該組成物可以用於向個體投與之單位劑型來製備。投與量和時間由主治臨床醫師酌情判斷，以達到預期結果。該組成物可配製為用於全身（如靜脈內）或局部（如腫瘤內）投與。在一實例中，所揭示

之 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、抗體、抗原結合片段、共軛物係經配製，以用於非經腸胃投與，如靜脈內投與。包括如本文所述之 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、共軛物、抗體或抗原結合片段之組成物，可用於如治療及偵測腫瘤，例如且不限於，神經母細胞瘤。在一些實例中，該組成物可用於治療或偵測癌症。包括如本文所述之 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、共軛物、抗體或抗原結合片段之組成物，亦用於例如偵測病理性血管生成。

【0511】　用於投與之組成物可包括溶於醫藥學上可接受的載體(例如水性載體)中的 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、共軛物、抗體或抗原結合片段之溶液。可使用各種水性載體，例如，緩衝生理食鹽水及其類似物。這些溶液是無菌的，通常不含不希望的物質。這些組成物可藉由習知且熟知之滅菌技術來滅菌。該組成物可根據需要包含醫藥學上可接受的輔助物質以接近生理條件，例如 pH 調節劑和緩衝劑、毒性調節劑、佐劑及類似物，例如乙酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、乳酸鈉及類似物。在此等調配物中之 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、抗體或抗原結合片段或共軛物的濃度可廣泛地變化，且將主要根據所選擇的特定投與方式和個體的需要來選擇，主要基於流體體積、黏度、體重及類似因素。製備用於基因療法、免疫療法及/或細胞療法的此類劑型的實際方法，對於本領域技術人員而言是已知的或將是顯而易見的。

【0512】　在一些實施例中，該組成物包含與一或多種醫藥學上或生理學上可接受之載體、稀釋劑或賦形劑組合之GCC CAR。此類組成物可包含緩衝液，例如中性緩衝生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水及類似物；醣類如葡萄糖、甘露醣、蔗醣或葡聚醣、甘露醣醇；蛋白質；多肽或胺基酸如甘胺酸；抗氧化劑；螯合劑例如 EDTA 或穀胱甘肽；佐劑（例如氫氧化鋁）；和防腐劑。本發明的組成物在一態樣中被配製成用於靜脈內投與。

【0513】　本發明的醫藥組成物可以適合待治療(或預防)的疾病的方式投與。投與的量及頻率將取決於如患者之條件、患者疾病之類型及嚴重程度等因素，儘管適當劑量可藉由臨床試驗決定。

【0514】 在一實施例中，該醫藥組成物實質上不含，例如，無可偵測位準的污染物，例如，選自於內毒素、黴漿菌、複製勝任慢病毒(RCL)、p24、VSV-G 核酸、HIV gag、殘留的抗 CD3/抗 CD28 包覆微珠、小鼠抗體、匯集的人類血清、牛血清白蛋白、牛血清、培養基成分、載體組裝細胞或質體成分、細菌和真菌。在一實施例中，該細菌為至少一種選自由以下組成之群：糞產鹼桿菌、白色念珠菌、大腸桿菌、流感嗜血桿菌、腦膜炎奈瑟菌、銅綠假單胞菌、金黃色葡萄球菌、肺炎鏈球菌和化膿性鏈球菌 A 群。

【0515】 在一態樣中，本發明提供一種表現 CAR 的細胞群，例如，CART 細胞或表現 CAR 的 NK 細胞。在一態樣中，本發明提供一種方法，其包含投與與另一試劑(例如激酶抑制劑，如本文所述之激酶抑制劑)組合的表現 CAR 的細胞群(例如，CART 細胞或表現 CAR 的 NK 細胞)。

【0516】 在另一態樣中，本發明係相關於一種包含本文所述之載體的細胞。在一實施例中，該細胞為本文所描述之細胞，例如人類 T 細胞，例如本文所描述之人類 T 細胞。在一實施例中，該人類 T 細胞為 CD8+ T 細胞。

【0517】 在另一態樣中，本發明係相關於一種製造細胞之方法，包含將本文所述之細胞(例如本文所述之 T 細胞)，以包含編碼 CAR (例如本文所述之 CAR)之核酸之載體進行轉染。

【0518】 本發明亦提供一種產生 RNA-經改造之細胞群的方法，例如本文所述之細胞，例如暫時表現外源性 RNA 之 T 細胞。該方法包含將體外轉錄的 RNA 或合成的 RNA 引入細胞，其中 RNA 包含編碼本文所述的 CAR 分子之核酸。

【0519】 在本文所描述之任一方法及組成物之實施例中，該包含 CAR 之細胞包含編碼 CAR 之核酸。在一實施例中，該編碼 CAR 之核酸為慢病毒載體。在一實施例中，該編碼 CAR 之核酸藉由慢病毒轉導引入至細胞中。在一實施例中，該編碼 CAR 之核酸為 RNA，例如體外轉錄之 RNA。在一實施例中，該編碼 CAR 之核酸藉由電穿孔引入至細胞中。

【0520】 在本文所描述之任一方法及組成物的實施例中，該細胞為 T 細胞或

NK 細胞。在一實施例中，該 T 細胞為自體或同種異體 T 細胞。

【0521】 用於靜脈內投與的典型組成物包括約 0.01 至約 30 mg/kg 的抗體或抗原結合片段或共軛物每個體每日（或 CAR、或表現 CAR 的 T 細胞、或包括抗體或抗原結合片段的共軛物的相對應劑量）。用於製備可投與組成物之實際方法將為熟習此項技術者所已知或顯而易見，且更詳細描述於文獻如 Remington's Pharmaceutical Science，第 19 版，Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)。

【0522】 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、抗體、抗原結合片段、或共軛物可以凍乾形式提供，且在投與之前以無菌水再水合化，儘管其亦以已知濃度之無菌溶液提供。接著將該 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、抗體、抗原結合片段、或共軛物溶液添加至含有 0.9%氯化鈉、USP 之輸注袋中，且在某些案例中以 0.5 mg/kg 至 15 mg/kg 體重之劑量投與。在抗體或抗原結合片段和共軛物藥物的投與方面，在本領域中已有相當多的經驗； 例如，自 1997 年 RITUXAN® 獲核准以來，抗體藥物已在美國上市。CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、抗體、抗原結合片段、或其共軛物，可藉由緩慢輸注來投與，而非靜脈推注或大劑量投與。在一實例中，投與較高載入劑量，隨後在較低位準下投與維持劑量。舉例而言，初始載入劑量 4 mg/kg 抗體或抗原結合片段(或包括抗體或抗原結合片段之共軛物之對應劑量)可在 90 分鐘期間輸注，若先前劑量耐受良好，則隨後在 30 分鐘期間輸注 2 mg/kg 之用於 4-8 周之每周維持劑量。

【0523】 經控制釋放腸胃外配方可製成植入物、油劑注射液或顆粒系統。有關蛋白質遞送系統的廣泛概述，可參見 Banga， A. J.， Therapeutic Peptides and Proteins：Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995)。顆粒系統包括微球體、微顆粒、微膠囊、奈米膠囊、奈米球及奈米顆粒。微膠囊含有治療性蛋白質，如細胞毒素或藥物，作為中心核心。在微球體中，該治療劑分散在整個顆粒中。小於約 1 μm 之顆粒、微球體及微膠囊通常分別稱為奈米顆粒、奈米球體及奈米膠囊。微血管具有約 5 μm 的直徑，因此只有奈米顆粒可靜脈內投與。微粒一般直徑約 100 μm，以皮

下或肌肉注射方式投與。請參見例如 Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter 編，Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.，第 219-342 頁(1994)；及 Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus 編，Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y.，第 315-339 頁(1992)。

【0524】 聚合物可用於本文揭示之 CAR 或表現 CAR 之 T 細胞、抗體、或抗原結合片段、或共軛物組成物之離子控制釋放。用於經控制藥物遞送的各種可降解和不可降解之聚合物基質為本領域中已知的(Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993)。舉例而言，嵌段共聚物 polaxamer 407，在低溫下以黏稠但流動的液體形式存在，但在體溫下形成半固體凝膠。它已被證明是重組介白素-2 和脲酶的配製和持續遞送的有效載體(Johnston 等人, Pharm. Res. 9:425-434, 1992；及 Pec 等人，J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990)。或者，羥基磷灰石已被使用作為蛋白質控制釋放的微載體(Ijntema 等人， Int. J. Pharm. 112：215-224， 1994)。在又一態樣中，脂質體係用於脂質包裹藥物的控制釋放以及藥物靶向(Betageri 等人, Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa. (1993))。已知用於控制治療性蛋白質之遞送的多種額外系統(參見美國專利號 5,055,303; 5,188,837; 4,235,871; 4,501,728; 4,837,028; 4,957,735; 5,019,369; 5,055,303; 5,514,670; 5,413,797; 5,268,164; 5,004,697; 4,902,505; 5,506,206; 5,271,961; 5,254,342 和 5,534,496)。

套組

【0525】 在一態樣中，亦提供使用本文所揭示之 CAR 的套組。例如，用於治療個體之腫瘤，或製造表現本文所揭示之一或多種 CAR 的 CAR T 細胞的套組。該套組通常將包括如本文所揭示之抗體、抗原結合片段、共軛物、核酸分子、CAR 或表現 CAR 之 T 細胞。大於一種之如本文所揭示之抗體、抗原結合片段、共軛物、核酸分子、CAR 或表現 CAR 之 T 細胞可包括在該套組中。

【0526】 該套組可包括一容器及在該容器上或與其相連的標籤或包裝插頁。合適的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由各種材料形成，如玻璃

或塑膠。該容器通常容置一組成物，其包含所揭示之抗體、抗原結合片段、共軛物、核酸分子、CAR 或表現 CAR 之 T 細胞之一或多者。在數個實施例中，該容器可具有無菌入口(例如，容器可為靜脈注射溶液袋，或具有可被皮下注射針刺穿的塞子的小瓶)。標籤或包裝插頁說明該組成物用於治療特定病況。

【0527】 標籤或包裝插頁通常將進一步包括所揭示之抗體、抗原結合片段、共軛物、核酸分子、CAR 或表現 CAR 之 T 細胞的使用說明，例如，用於治療或預防腫瘤或製造 CAR T 細胞的方法中。包裝插頁通常包括常規包含在治療產品的商業包裝中的說明，這些說明包含有關使用此類治療產品的適應症、用法、劑量、投藥、禁忌症及/或警告的信息。該說明書材料可為書面，以電子形式（例如電腦硬碟或光碟）或視覺形式（例如影片檔案）。該套組亦可包括額外組件，以幫助套組設計之特定應用。因此，例如，該套組可額外地含有偵測標記物(例如用於酵素標記的酵素受質、用於偵測螢光標記物的過濾組、合適的二級標記物(例如二級抗體)及類似物)之裝置。該套組可額外包括緩衝液及常規用於實施特定方法的其他試劑。此套組與合適內容物為熟習此項技術者所熟知的。

調節嵌合抗原受體的策略

【0528】 有許多方式可調節 CAR 活性。在一些實施例中，其中 CAR 活性可經控制的可調節 CAR (RCAR)，是最佳化 CAR 治療的安全性和有效性的理想選擇。舉例而言，使用例如融合到二聚化結構域的半胱天冬酶誘導細胞凋亡(請參見例如 Di 等人, N Engl. J . Med. 2011 Nov. 3; 365(18):1673- 1683))，可使用作為本發明之 CAR 療法中的安全性開關。在另一實例中，表現 CAR 的細胞亦可表現誘導型 Caspase-9 (iCaspase-9) 分子，該分子在投與二聚化藥物（例如，利米杜克(rimiducid)（也稱為 AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals)或 AP20187 (Ariad)）後，會導致 Caspase-9 的活化和細胞的凋亡。iCaspase-9 分子含有二聚化化學誘導劑(CID)結合域，可在 CID 存在下介導二聚化。這導致表現 CAR 的細胞的誘導性和選擇性耗盡。在某些情況下，iCaspase-9 分子由與編碼 CAR 的載體分開的核酸分子編碼。在某些情況下，iCaspase-9 分子由與編碼 CAR 的載體相同的

核酸分子編碼。該 iCaspase-9 可提供安全性開關，以避免表現 CAR 的細胞的任何毒性。請參見例如 Song 等人, Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963；及 Di Stasi 等人 N. Engl. J . Med. 2011; 365:1673-83。

【0529】 用於調節本發明的 CAR 療法的替代策略包括使用使 CAR 活性失活或關閉的小分子或抗體，例如藉由刪除表現 CAR 的細胞，例如藉由誘發抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)。例如，本文所述之表現 CAR 的細胞亦可表現一抗原，其能夠被誘導細胞死亡(例如 ADCC 或互補誘導細胞死亡)的分子辨識。例如，本文所描述之表現 CAR 的細胞也可表現能夠被抗體或抗體片段靶向的受體。此類受體的實例包括 EpCAM、VEGFR、整聯蛋白(例如整聯蛋白 anb3、a4、aI¾b3、a4b7、a5b1、anb3、an)、TNF 受體超家族成員(例如，TRAIL-R1、TRAIL-R2)、PDGF 受體、干擾素受體、葉酸受體、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6 受體、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD1 1、 CD1 1 a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/lgE 受體、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/basigin、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7 和 EGFR 及其截短形式（例如，保留一或多個細胞外表位但缺乏細胞內域中一或多個區域）。例如，本文所述之表現 CAR 的細胞亦可表現截短的表皮生長因子受體(EGFR)，其缺乏信號傳導能力但保留表位，其可被能誘導 ADCC 的分子例如西妥昔單抗(ERBITUX®)辨識，使得投與西妥昔單抗可誘導 ADCC 和隨後的表現 CAR 的細胞耗盡(請參見如 WO2011/056894 和 Jonnalagadda 等人, Gene Ther. 2013; 20(8)853-860)。

【0530】 另一種策略包括在本文所述之表現 CAR 的細胞中表現高度壓縮的標記/自殺基因，其結合至來自本文所述之 CD32 和 CD20 抗原的標靶表位，其可與利妥昔單抗結合，導致表現 CAR 的細胞的選擇性耗盡，例如藉由 ADCC(請參見如 Philip 等人，Blood. 2014; 124(8)1277-1287)。用以耗盡本文所

述之表現 CAR 的細胞的其他方法包括投與 CAMPATH®，一種單株抗-CD52 抗體，其選擇性結合至且靶向成熟淋巴細胞(例如表現 CAR 的細胞)，用於破壞(例如藉由誘導 ADCC)。在其他實施例中，表現 CAR 的細胞可使用 CAR 配位體(例如抗-特應性抗體)選擇性地靶向。在一些實施例中，抗特應性抗體可引起效應細胞活性，例如 ADCC 或 ADC 活性，藉此降低表現 CAR 的細胞之數目。在其他實施例中，CAR 配位體(例如抗特應性抗體)可耦合至可誘導細胞死亡之試劑，例如毒素，藉此降低表現 CAR 的細胞之數目。替代地，CAR 分子本身可被配置成使得活性可被調節，例如打開和關閉，如下所述。

【0531】 在一些實施例中，RCAR 包含一組多肽，在最簡單的實施例中通常為兩個，其中本文描述的標準 CAR 之成分，例如抗原結合域和細胞內信號傳導域，被分配在不同的多肽或成員上。在一些實施例中，該多肽組包括一個二聚化開關，在二聚化分子的存在下，可將該多肽相互耦合，例如，可將抗原結合域與一細胞內信號傳導域耦合。

【0532】 此類可調節 CAR 的額外描述和例示性配置提供於本文和國際公開號 WO 2015/090229 中，其經由引用整體併入本文。在一實施例中，RCAR 包含兩種多肽或成員：1)細胞內信號傳導成員，其包含細胞內信號傳導域(例如本文所述的初級細胞內信號傳導域)、和第一開關域；2)抗原結合成員，其包含抗原結合域(例如，靶向本文所述的腫瘤抗原，如本文所述)、和第二開關域。視情況，該 RCAR 包含本文所述的跨膜域。在一實施例中，跨膜域可設置在細胞信號傳導成員、抗原結合成員、或兩者上。（除非另有說明，當在此描述 RCAR 的成員或元件時，順序可如本文提供，但也包括其他順序。換言之，在一實施例中，順序如其內文中所述，但在其他實施例中，順序可以不同。例如，跨膜區一側的元件順序可與實例不同，例如，開關域相對於細胞內信號結構域的位置可不同，例如，倒置）。

【0533】 在一實施例中，該第一開關域和該第二開關域可形成一細胞外二聚化開關。在一實施例中，該二聚化開關可為同二聚化開關，例如，其中第一及

第二開關域為相同的，或異二聚化開關，例如，第一及第二開關域彼此不同。

【0534】 在實施例中，RCAR 可包括一「多重開關」。多重開關可包含異二聚開關域或同二聚物開關域。多重開關在第一成員(例如抗原結合成員)和第二成員(如細胞內信號傳導成員)上，獨立地包含複數個例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個開關域。在一實施例中，該第一成員可包含複數個第一開關域，且第二成員可包含複數個第二開關域。在一實施例中，該第一成員可包含第一及第二開關域，且第二成員可包含第一及第二開關域。

【0535】 在一實施例中，該細胞內信號傳導成員包括一或多個細胞內信號傳導域，例如，一個初級細胞內信號傳導域及一或多個共刺激信號傳導域。

【0536】 在一實施例中，該抗原結合成員可包含一或多個細胞內信號傳導域，例如一或多個共刺激信號傳導域。於一實施例中，該抗原結合成員包括複數個例如 2 或 3 個本文中描述之共刺激信號傳導域，例如選自 4-IBB、CD28、CD27、ICOS 及 OX40，且在實施例中，無初級細胞內信號傳導域。於一實施例中，該抗原結合成員包含下列共刺激信號傳導域，自細胞外至細胞內方向：4-1BB-CD27; 4-1BB-CD27; CD27-4-1BB; 4-1BBCD28; CD28-4-1BB; OX40-CD28; CD28-OX40; CD28-4-1BB;或 4-1BB-CD28。在此類實施例中，該細胞內結合成員包含一 CD3ζ 域。在一此類實施例中，該 RCAR 包含(1)一抗原結合成員，其包含一抗原結合域、一跨膜域、及兩個共刺激信號傳導域及一第一開關域；及(2)一細胞內信號傳導域，其包含一跨膜域或膜連結域、及至少一初級細胞內信號傳導域、及一第二開關域。

【0537】 一實施例提供 RCAR，其中該抗原結合成員未連接至 CAR 細胞表面。這允許具有一細胞內信號傳導成員之細胞與一或多個抗原結合域可方便地配對，而無需以編碼該抗原結合成員的序列轉化該細胞。在此類實施例中，RCAR 包括：1) 細胞內信號傳導成員，其包含：一第一開關域、一跨膜域、一細胞內信號傳導域(例如初級細胞內信號傳導域)、和一第一開關結構域； 2)抗原結合成員，其包含：一抗原結合域和一第二開關域，其中該抗原結合成員不

包含跨膜結構域或膜連結域，且視情況不包含細胞內信號傳導域。在一些實施例中，RCAR 可進一步包含 3)第二抗原結合成員，其包含：一第二抗原結合域(其結合至不同於該抗原結合域所結合的抗原上)；和一第二開關域。

【0538】 本文亦提供 RCAR，其中該抗原結合成員包含雙特異性活化及靶向能力。在此實施例中，該抗原結合成員可包含複數個例如 2、3、4 或 5 個抗原結合域，例如 scFvs，其中每一抗原結合域結合至標靶抗原，例如不同抗原或相同抗原，例如同一抗原上之相同或不同表位。在一實施例中，該複數個抗原結合域係串聯，且視情況，每一抗原結合域之間設置有連接子或鉸鏈區。合適的連接子及鉸鏈區描述於本文中。

【0539】 一實施例係提供具有允許增殖狀態切換之組態的 RCAR。在此實施例中，該 RCAR 包含： 1)細胞內信號傳導成員，其包含：視情況，一跨膜域或膜連結域；一或多個共刺激信號傳導域，例如選自 4-IBB、CD28、CD27、ICOS 和 OX40，以及一開關域；以及 2)抗原結合成員，其包含：一抗原結合域、一跨膜域和一初級細胞內信號傳導域，例如 CD3ζ 域，其中該抗原結合成員不包含開關域，或不包含與細胞內信號傳導成員上的開關域二聚化之開關域。在一實施例中，該抗原結合成員不包含共刺激信號傳導域。在一實施例中，該細胞內信號傳導成員包含來自同二聚化開關之開關域。在一實施例中，該細胞內信號傳導成員包含來自異二聚化開關之第一開關域，且該 RCAR 包含第二細胞內信號傳導成員，其包含來自異二聚化開關之第二開關域。在此類實施例中，該第二細胞信號傳導成員包含與該細胞內信號傳導成員相同的細胞內信號傳導域。在一實施例中，該二聚化開關為細胞內。在一實施例中，該二聚化開關為細胞外。

【0540】 本文亦提供包含 RCAR 編碼序列之核酸及載體。編碼 RCAR 之各元件的序列可設置在相同核酸分子(例如，相同質體或載體，例如病毒載體，例如慢病毒載體)上。

【0541】 於一實施例中，(i)編碼抗原結合成員之序列及(ii)編碼一細胞內信號

傳導成員之序列，可存在於同一核酸例如載體上。相對應蛋白質之製造可例如藉由使用分開的促進子，或藉由使用雙順反子轉錄產物(其可藉由裂解單一轉譯物或藉由轉譯兩種單獨的蛋白質產物來製造兩種蛋白質)而實現。在一實施例中，編碼可裂解胜肽(例如 P2A 或 F2A 序列)之序列係設置於(i)與(ii)之間。於一實施例中，編碼 IRES(例如 EMCV 或 EV71 IRES)的序列係設置在(i)與(ii)之間。在這些實施例中，(i)及(ii)被轉錄為單一 RNA。在一實施例中，該第一促進子可操作地連接於(i)，且第二促進子可操作地連接於(ii)，使得(i)及(ii)被轉錄為分開的 mRNA。

【0542】 替代地，編碼 RCAR 之各種元件的序列可設置在不同的核酸分子上，例如，不同的質體或載體，例如，病毒載體，例如，慢病毒載體。例如，(i)編碼抗原結合成員之序列可存在於第一核酸(例如第一載體)上，且(ii)編碼細胞內信號傳導成員之序列可存在於第二核酸(例如第二載體)上。

【0543】 除非另有說明，否則本文使用的所有技術和科學術語和片語與本領域普通技術人員通常理解的含義相同。儘管在本發明的實施或測試中可使用與本文描述的那些相似或等效的任何方法和材料，但現在描述較佳的方法和材料。本文提及的所有文獻均以引用方式併入本文中。

【0544】 標準技術可用於重組 DNA、寡核苷酸合成以及組織培養和轉型(例如，電穿孔、脂質轉染)。酵素反應和純化技術可根據製造商的說明書或如本領域中通常完成者或如本文所述進行。前述技術和程序一般可根據本領域已知的常規方法進行，並如在本說明書整篇引用和討論的各種一般性和更具體的參考文獻中所描述的。請參見例如 Sambrook 等人 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))，其出於任何目的經由引用方式併入本文中。

【0545】 本文提及的所有文獻、專利申請案、專利案和其他參考文獻均以全文引用方式併入本文中。本發明將藉由參考以下實例而更臻清楚。

實例

【0546】 這些實例的提出是為了幫助理解本發明，但並非旨在，也不應解釋為以任何方式限制其範圍。實例不包括對本領域普通技術人員已知的常規方法(分子選殖技術等)的詳細描述。

實例 1. GCC VH 抗體之分離與篩選

【0547】 製備特異性靶向人類 GCC 的單域重鏈抗體(VH)(例如，表 1 至 3 中提供的抗 GCC 結合劑)。如表 5 所示，評估重組單域抗 GCC VH 構建體在體外對 GCC 的結合親和力。結合動力學使用 Octet 結合測定法測定。這些係於即時生物層干涉儀基礎之生物感測器 Octet (ForteBio)中測量。所有結合研究均在 HBS-ET Octet 動力學緩衝液中進行。生物感測器總是在不同步驟之間以 Octet 動力學緩衝液洗滌。對每一 VH 進行七點、兩倍的稀釋系列。結合步驟的每一者的接觸時間為 300 秒，解離步驟在 400-600 秒之間變化。動力學結合(ka)和解離(kd)速率常數藉由使用 ForteBio 分析軟體處理數據，並將其套用至 1:1 結合模型而確定。親和力計算值和動力學常數列於表 5。

【0548】 使用流式細胞術測量單域抗體與 CT26 細胞的結合。CT26 細胞與系列稀釋的 VH 一起培養，並藉由流式細胞術測量螢光值。藉由 FACS 劑量反應測定法證實抗 GCC VH 抗體與 CT26 細胞結合，以獲得細胞結合 EC50 (nM)，如表 5 所示。

表 5. GCC VH 抗體之結合親和力

GCC 抗原結合劑	Koff (1/s)	KD(M)	與細胞結合之 EC50 (M)
V1	0.00020795	3.2935E-10	7.2E-10
V5	0.000718667	7.713E-09	1.52E-09
V36	0.0035	0.000000105	N/A
V48	0.000341	1.375E-09	1.01E-09
V51	0.00185	9.544E-09	N/A

【0549】 為了測定穩定性，對 VH 構建體進行尺寸排阻層析法(SEC)。簡而言之，將純化的 VH 以不同濃度儲存在 PBS 緩衝液中，並於 4°C 過夜，之後使用 SEC 管柱在不同時間點進行分析。將樣本注入磷酸鈉緩衝液中。隨時間收集數據，並計算儲存後剩餘的單體峰面積，與開始時(T=0)存在者相較。獲得穩定性結果，如下表 6 所示。

表 6. 使用 SEC 的隔夜穩定度

抗 GCC VH 抗體	% 4°C 單體(%)	純度(%)	RT (分鐘)
V1	108.4	91.5	3.586
V5	123.04	79.2	3.17
V36	92.43	79.36	3.08
V48	104.54	73.91	3.208
V51	109.2	59.22	3.304

【0550】 進行 ELISA 以測量 VH 與人類輕鏈的結合。每一 VH 的結合值(於 OD450nm 測量)皆小於 0.1，其為此測定法的背景訊號。

實例 2. GCC 嵌合性抗原受體的設計與鑑定

【0551】 嵌合性抗原受體構建體被設計成包括一胞外結合域(例如，抗 GCC 結合物序列)，其包含上述單域抗體(例如，表 2 或表 3 中提供的 VH)。CAR T 構建體是藉由將框架內的結合子序列連接到 CD28 鉸鏈/跨膜域和共刺激域以及 CD3 ζ-1xx 信號傳導域而產生。例示性 CAR 構建體的流程圖示於圖 1A 和 1B。在此實例中測試的例示性 CAR 構築體序列係提供於表 4 中。V1 (SEQ ID NO: 1)及 V1-01 (SEQ ID NO: 20)預期適用於以下實例中。

【0552】 將編碼 CAR 構建體序列(SEQ ID NO: 61-70)的核酸選殖到逆轉錄病毒質體骨架中。藉由暫時轉染 phenix ampho 細胞(ATCC CRL-3213)產生含有逆轉錄病毒載體的上清液，收穫含有逆轉錄病毒載體的上清液，並儲存於-80°C。

【0553】 來自健康供應者的人類初級 T 細胞，係純化自由 leukopaks (購自經捐贈者書面同意的商業提供者)分離出的周邊血液單核細胞(PBMC)，使用 CD3+

細胞進行免疫磁珠篩選，根據製造商提供的流程(EasySep™ Human T Cell Isolation Kit, Stem Cell Technologies #17951)。T 細胞在補充有 10% 青黴素-鏈黴素(Gibco 15140-122)和 2 ng/ml IL-2 (Milteyni 130-097-743)之 X-vivo 15 培養基((Lonza #04-744Q)中，以每毫升 1 百萬個細胞之密度培養。細胞以 CD3/CD28 MACS® T Cell TransAct 試劑(Miltenyi Biotec MACS #130-111-160)活化，並在第 2 天或第 3 天以編碼 CAR 構建體的逆轉錄病毒載體轉導過夜。隔日，將 CAR-T 細胞培養物轉移到 G-Rex6®孔盤(WilsonWolf P/N 80240M)，並在補充有 10%青黴素-鏈黴素(Gibco 15140-122)和 2 ng/ml IL-2 (Milteyni 130-097-743)的 X-vivo 15 培養基(Lonza #04-744Q)中繁殖，直到第 7-10 天收穫。每 2-3 天進行一次培養基更換和 IL-2 補充。

【0554】 CAR T 細胞表現係藉由流式細胞術評估，使用抗 EGFR 抗體(R&D systems: FAB9577R)或用於 CAR 表面表現之可溶性 GCC 胞外域重組蛋白。

實例 3. GCC CAR T 細胞體外活性

【0555】 本實例描述體外之抗 GCC CAR T 細胞活性。檢驗表現抗 GCC CAR (SEQ ID NO: 48-52)的 CAR-T 細胞對於表現 GCC 的及 GCC 陰性的標靶癌細胞株的細胞毒性。標靶癌細胞株包括內源性表現 GCC 的 GSU、LS1034 和 HT55，以及 HT29-GCC (一種經改造以穩定表現 GCC 的人類大腸直腸癌細胞株)及其載體對照細胞株(即 GCC 陰性) HT29-vec。每一標靶細胞株係接種在 384 孔盤中，並以效應子-比-標靶(E:T)為 10:1、3:1、1:1 和 0.3:1 之比例加入 GCC CAR-T 或非靶向 CAR-T 細胞(陰性對照組)。僅包含標靶細胞之孔和僅包含效應細胞之孔作為對照組。兩天後，使用 CellTiter-Glo® One Solution Assay (Promega, G8462)測量細胞存活率。標靶細胞的存活率百分比係由共培養孔的發光訊號計算，首先減去僅有效應細胞之孔的信號，之後除以僅有標靶細胞之孔的信號。殺傷百分比係藉由將 100% GCC CAR-T 細胞減去標靶細胞的存活率百分比而計算。

【0556】 與作為對照組的非靶向 CD19 CAR-T 細胞(1928z-1xx)相較，VH 抗 GCC 結合劑表現出針對表現 GCC 的標靶細胞株的細胞殺傷。如圖 2A-2D 所示，

在不存在截短 EGFR (tEGFR)的情況下表現抗 GCC CAR 的 CAR-T 細胞係顯現出對於表現 GCC 的細胞 HT29-GCC 細胞(被改造為可穩定表現 GCC 之人類大腸直腸癌細胞株 HT29)的體外細胞毒性(圖 2A)；以及對於內源性表現 GCC 的細胞株 GSU(圖 2C)和 LS1034(圖 2D)的體外細胞毒性。如圖 3A-3D 所示，在截短的 EGFR (tEGFR) (SEQ ID NO: 56-60)存在下表現抗 GCC CAR 的 CAR-T 細胞亦顯現出對於表現 GCC 的細胞 HT29-GCC(圖 3A)的體外細胞毒性；以及對於 GSU(圖 3C)和 LS1034(圖 3D)的體外細胞毒性。長條代表來自三次技術重複的平均值+SD 值。數據代表來自>3 個供體的抗 GCC CAR T 細胞進行的>3 個獨立實驗。GCC CAR-T 細胞並未表現出對 GCC 陰性 HT29-vec 細胞的細胞殺傷(圖 2B 和圖 3B)，表示 GCC CAR-T 細胞殺傷活性為抗原-依賴性。

【0557】 除了抗原-依賴性細胞殺傷，GCC CAR-T 細胞的體外活性亦藉由評估該細胞的 IFNγ 和 IL2 的抗原-依賴性分泌情況而評估。具有抗 GCC VH 結合劑的 GCC CAR-T 細胞與表現 GCC 和 GCC 陰性的標靶癌細胞係以 E:T 比例 10:1、3:1、1:1 和 0.3:1 共培養。共培養兩天後收集上清液。使用 Intellicyt QBeads Human PlexScreen 套組(Sartorius, 90702)偵測上清液中分泌的 IFNγ 和 IL2。當與表現 GCC 的標靶細胞共培養時，具有所有 VH 結合劑的 GCC CAR-T 細胞，在 tEGFR 存在(5A-5D)和不存在(4A-4D)的情況下都會分泌 IFNγ，但與 GCC-陰性標靶細胞共培養時則不然(圖 4B 和 5B)，指出此為抗原-依賴性細胞因子釋放。當與表現 GCC 的標靶細胞共培養時，具有所有 VH 結合劑的 GCC CAR-T 細胞，在 tEGFR 存在(7A-7D)和不存在(6A-6D)的情況下都會分泌 IL2，但與 GCC-陰性標靶細胞共培養時則不然(圖 6B 和 7B)，指出此為抗原-依賴性細胞因子釋放。

實例 4：GCC CAR T 細胞體內活性

【0558】 本實施例描述體內之抗 GCC CAR T 細胞活性。在內源性表現鳥苷酸環化酶 C (GCC)的多重人類大腸直腸癌腫瘤異種移植模型中，研究具有不同 VH 結合子的 GCC CAR-T 的抗腫瘤活性。非肥胖糖尿病/嚴重聯合免疫缺陷/γ 鏈-/-(NSG)小鼠，係使用 HT55 細胞、LS1034 細胞或 GSU 細胞進行皮下接種。當

平均腫瘤體積達到約 150 mm^3 時，緊急靜脈內(IV)投與 GCC CAR-T 細胞或模擬 T 細胞（非靶向 CAR-T）。評估不同劑量位準及供體來源，且如圖 8A-18 所示。腫瘤體積及體重每星期測量兩次，至多 50 天。

【0559】 在以由兩個不同的健康供體 D393 (圖 8A)和 D686 (圖 8B)製造之抗 GCC CAR-T 細胞治療的 HT55 模型（內源性表現之表現 GCC 的大腸直腸癌，GCC H 分數 = 300/300）中測定平均腫瘤體積(mm^3)隨時間（40 天）的變化。在以由三個不同的健康供體 D393 (圖 9A)、D797 (圖 9B)和 D954 (圖 9C)製造之抗 GCC CAR-T 細胞治療的 HT55 模型中測定平均腫瘤體積(mm^3)隨時間（42 天）的變化。在以由健康供體 D393 (圖 10A)、D797 (圖 10B)和 D954 (圖 10C)製造之共表現 tEGFR 之抗 GCC CAR-T 細胞治療、以及由健康供體 D393 製造之不存有 tEGFR 之抗 GCC CAR-T 細胞治療的 HT55 模型中測定平均腫瘤體積(mm^3)隨時間（42 天）的變化。在以由三個不同的健康供體 D393 (圖 11A)、D954 (圖 11B)和 D686 (圖 11C)製造之抗 GCC CAR-T 細胞治療的 HT55 模型中測定平均腫瘤體積(mm^3)隨時間（42 天）的變化。在以由健康供體 D393 (圖 12A)、D954 (圖 12B)和 D686 (圖 12C)製造之共表現 tEGFR 之 v48 抗 GCC CAR-T 細胞治療的 HT55 模型中測定平均腫瘤體積(mm^3)隨時間（42 天）的變化，劑量為 0.25 x 10^6 個 CAR+細胞、0.5 x 10^6 個 CAR+細胞、或 1 x 10^6 個 CAR+細胞。

【0560】 在以由兩個健康供體 D393 (圖 13A)、D954 (圖 13B)、D393 (圖 15A)、D954 (圖 15B)和 D686 (圖 15C)製造之不存有 tEGFR 之抗 GCC CAR-T 細胞治療的 GSU 模型（內源性表現 GCC 的胃癌，GCC H 分數=170/300）中測定平均腫瘤體積(mm^3)隨時間（42 天）的變化。在以由不同健康供體 D393 (圖 14A)、D954 (圖 14B)、D393 (圖 16A)、D954 (圖 16B)和 D686 (圖 16C)製造之共表現 tEGFR 之抗 GCC CAR-T 細胞治療的 GSU 模型（內源性表現 GCC 的胃癌，GCC H 分數=170/300）中測定平均腫瘤體積(mm^3)隨時間（42 天）的變化。

【0561】 在以由一個健康供體製造之共表現 tEGFR (圖 18)或不存有 tEGFR (圖 17)之抗 GCC CAR-T 細胞治療的 LS1034 模型（內源性表現 GCC 的大腸直

腸癌，GCC H 分數=300/300）中測定平均腫瘤體積(mm^3)隨時間（42 天）的變化。

【0562】 與各自的對照組相較，來自多個供體的 GCC CAR-T 細胞的緊急 IV 投與，會導致所有腫瘤模型中的腫瘤生長顯著抑制。與各自的對照組相較，在接受 GCC CAR T 細胞治療的 LS1034 或 GSU 腫瘤 NSG 小鼠中，沒有觀察到顯著的體重減輕。在 HT-55 腫瘤模型中，觀察到的體重減輕是由於腫瘤負荷造成的。GCC CAR-T 細胞治療後的腫瘤負荷降低可導致體重增加。

【0563】 已描述本發明的至少一實施例的幾個態樣，應當理解，各種改變、修飾和增進對於本領域技術人員來說將是顯而易見的。此類變更、修飾和增進旨在成為本揭示的一部分，且旨在落入本發明的精神和範圍內。因此，前面的描述和附圖僅作為示範，本發明由後附的申請專利範圍詳細描述。

序列表

【0564】 下表 7 提供本文揭示之描述及序列。

表 7. 序列表

SEQ ID NO	描述	序列
1	V1 vH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSD LWGRGTLVTVSS
2	CD8 跨膜域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
3	4-1BB 細胞內域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
4	CD3-ζ 信號傳導域	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL

		HMQALPPR
5	鉸鏈序列	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD
6	前導序列 (v1)	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
7	前導序列 (v5、v36、v48、v51)	MELGLSWVFLVAILEGVQC
8	V1 HCDR1	HYYWS
9	V5 HCDR1	RYWMS
10	V36 HCDR1	RYWMT
10	V48 HCDR1	RYWMT
10	V51 HCDR1	RYWMT
11	V1 HCDR2	RIYPSGSTSYNPSLKS
12	V5 HCDR2	KIRHDGGEKYYVDSVKG
13	V36 HCDR2	KIKYDGSEKYYADSVKG
14	V48 HCDR2	KIRHDGGEKYYPDSVKG
15	V51 HCDR2	KIRHDGGEKYYADSVKG
16	V1 HCDR3	DRSTGWSEWNSDL
17	V5 HCDR3	DYTRDV
18	V36 HCDR3	DYNKDY
19	V48 HCDR3	DYNKDL
18	V51 HCDR3	DYNKDY
20	V1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSD LWGRGTLVTVSS
21	V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMS

		WVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDV WGQGTAVTVSS
22	V8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMS WVRQAPGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSVYLQMNSLRAEDTGVYYCATDFTRDV WGQGTTVTVSS
23	V9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMT WVRQAPGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVW GQGTTVTVSS
24	V30	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMS WVRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVW GQGTTVTVSS
25	V31	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMS WVRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDV WGQGTTVTVSS
26	V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMT WVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDY WGQGTLVTVSS
27	V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMT WVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTV SRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDL WGQGTLVTVSS
28	V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMT WVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTI

		SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDY WGQGTLVTVSS
29	CD28 鉸鏈域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK P
30	CD28 跨膜域	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
31	CD28 鉸鏈/跨膜域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
32	CD28 單域	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRS
33	CD3z-1XX 突變信號傳導域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEA FSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHM QALPPR
34	組合CAR跨膜及細胞內域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLL HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFS EIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ ALPPR
35	V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSG STSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA

		DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
		EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKG
		ERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
36	V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGG
		SLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKI
		RHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
		RAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSIEVMYP
		PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL
		VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM
		NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
		DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
		EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKG
		ERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
37	V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGS
		LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIK
		YDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRA
		EDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSIEVMYPPP
		YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVV
		VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM
		TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA
		PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
		GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGER
		RRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
38	V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS
		LRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIR
		HDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLR
		AEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSIEVMYPP
		PYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLV
		VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN

		MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGE RRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
39	V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIR HDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSIEVMYPP PYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLV VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKD KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTF DALHMQALPPR
40	熱穩定型腸毒素	NTFYCCELCCNPACAGCY
41	GCC AA 序列	MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYE ISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNA GLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKI SNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGS FGLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPF KTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALEASVSYFSH ELGFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEF LYKLKGDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDY MKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLN GILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYD GPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDT HVNKTYPVDMSPTFTWKNSKLPNDITGRGPQILMIA

		VFTLTGAVVLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKWSH IPPENIFPLETNETNHVSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKY DKKRVILKDLKHNDGNFTEKQKIELNKLLQIDYYNL TKFYGTVKLDTMIFGVIEYCERGSLREVLNDTISYPD GTFMDWEFKISVLYDIAKGMSYLHSSKTEVHGRLKS TNCVVDSRMVVKITDFGCNSILPPKKDLWTAPEHLR QANISQKGDVYSYGIIAQEIILRKETFYTLSCRDRNEK IFRVENSNGMKPFRPDLFLETAEEKELEVYLLVKNC WEEDPEKRPDFKKIETTLAKIFGLFHDQKNESYMDTL IRRLQLYSRNLEHLVEERTQLYKAERDRADRLNFML LPRLVVKSLKEKGFVEPELYEEVTIYFSDIVGFTTICK YSTPMEVVDMLNDIYKSFDHIVDHHDVYKVETIGDA YMVASGLPKRNGNRHAIDIAKMALEILSFMGTFELE HLPGLPIWIRIGVHSGPCAAGVVGIKMPRYCLFGDTV NTASRMESTGLPLRIHVSGSTIAILKRTECQFLYEVRG ETYLKGRGNETTYWLTGMKDQKFNLPTPPTVENQQ RLQAEFSDMIANSLQKRQAAGIRSQKPRRVASYKKG TLEYLQLNTTDKESTYF
42	v31 前導序列	MEFGLSWVFLVAIIKGVQC
43	tEGFR	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII RGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREC VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCT GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPK

		IPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
44	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
45	前導序列	MALPVTALLLPLALLLHAARP
46	V1 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSD LWGRGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFI IFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAP PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNE LQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA TKDTFDALHMQALPPR
47	V1 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSD LWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH VKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR
48	V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSG STSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAI

		EVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLL HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFS EIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ ALPPR
49	V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKI RHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIE VMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEI GMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQAL PPR
50	V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIK YDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRA EDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSD YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIG MKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALP PR

51	V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIR HDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLR AEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSRAAAIEV MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIG MKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALP PR
52	V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIR HDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEV MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKD KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTF DALHMQALPPR
53	連接子序列	RAAA
54	連接子序列	GGGGS
55	V1 CAR (28z1xx- tEGFR)	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSD LWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH

		VKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQ GLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII RGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREC VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCT GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
56	V1-01 CAR (28z1xx- tEGFR)	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSG STSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAI EVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLL HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFS EIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ ALPPR

		GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII RGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREC VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCT GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
57	V5 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKI RHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIE VMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEI GMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQAL PPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII RGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK

			ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREC VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCT GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
58	V36 (28z1xx-tEGFR)	CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIK YDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRA EDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSD YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIG MKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALP PR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII RGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREC VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCT GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
59	V48	CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS

(28z1xx-tEGFR)	LRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIR HDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLR AEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSRAAAIEV MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIG MKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALP PR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII RGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREC VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCT GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

60	V51 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIR HDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEV MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIG MKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALP PR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII RGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREC VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCT GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
61	V1-01 CAR 核酸序列	ATGGGCTGGTCTTGTATTATCTTGTTTCTCGTCGCA ACTGCTACAGGCGTTCATTCTGAAGTTCAACTCCA AGAATCTGGTCCTGGCCTGGTGAAACCTTCCGAAA CTCTCTCACTCACCTGTACCGTCTCAGGCGCTTCAA TATCACACTATTATTGGTCTTGGTTCCGGCAACCTG CAGGCAAAGGTCTCGAATGGATAGGCAGAATATA TCCCAGTGGAAGCACCTCCTATAATCCCTCTCTCA

		AGTCAAGAGTTGCAATGAGCGTTGACACACCCAA
		GAACCAATTCTCCCTCAAGCTGTCATCTGTAACTG
		CCGCCGATACTGCCGTTTACTACTGCGCTAGAGAT
		AGATCAACCGGATGGTCAGAATGGAATTCAGATCT
		GTGGGGACGGGGAACCCTCGTGACCGTATCTTCTC
		GGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCT
		TACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTA
		TCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCC
		CTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTG
		GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTT
		GCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
		GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTA
		CATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCC
		GCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
		TTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG
		GAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
		AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAA
		GAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
		CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG
		AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGC
		AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGAT
		TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG
		CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCAC
		CAAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCC
		TGCCCCCTCGC
62	V5 CAR	ATGGAACTGGGACTGTCTTGGGTGTTCCTGGTCGC
	核酸序列	TATATTGGAAGGAGTACAGTGCCAGGTCCAGCTCG
		TCGAGTCCGGGGGTGGCCTGGTGCAGCCCGGCGG
		CAGCCTCCGGCTGAGCTGCACAGCCTCAGGGTTTA

		CATTCAGCAGGTACTGGATGAGTTGGGTTAGGCAA
		GCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGGCCAAAA
		TCCGACATGATGGGGGCGAAAAGTACTATGTGGA
		TAGTGTGAAGGGACGGTTCACAATATCACGAGAC
		AATGCCAAAAACTCTTTGTACCTGCAAATGAACTC
		CCTGCGCGCCGAAGACACAGCTGTGTACTACTGCG
		CTACAGACTACACTAGGGACGTCTGGGGTCAAGG
		AACAGCCGTCACCGTGAGTAGTCGGGCGGCCGCA
		ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAAT
		GAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAG
		GGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGA
		CCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT
		GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT
		GGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGA
		GCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT
		CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCA
		GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATC
		GCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
		CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
		ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA
		TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
		ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG
		AAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
		GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
		GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
		TCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTC
		GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTA
		A
63	V36 CAR	ATGGAGCTGGGATTGTCCTGGGTTTTCCTGGTGGC

核酸序列

TATACTCGAAGGCGTACAGTGTGAAGTGCAGTTGG
TGGAGAGTGGCGGTGGCCTGGCCCAGCCGGGAGG
CTCTTTGAGACTCTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCAC
TTTCTCCCGCTATTGGATGACCTGGGTCCGGCAGG
CGCCCGGCGGACGCCTGGAGTGGGTGGCTAAGAT
CAAGTATGATGGATCAGAAAAATATTACGCAGAT
AGCGTAAAAGGCCGGTTCACAATATCCAGGGATA
ATGCAAAAAACTCCCTGTATCTGCAGATGGATAGC
CTGCGCGCTGAAGACACCGCCGTATATTATTGCAC
AAGAGACTACAATAAAGATTACTGGGGCCAGGGA
ACCCTGGTTACGGTGAGCTCACGGGCGGCCGCAAT
TGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGG
GAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGAC
CTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT
GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT
GGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGA
GCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT
CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCA
GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATC
GCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA
TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG
AAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
TCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTC

		GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
64	V48 CAR	ATGGAGCTGGGGCTTTCTTGGGTGTTTCTGGTAGC
	核酸序列	CATCCTCGAGGGAGTCCAGTGCGAGGTCCAGCTCG
		TCGAATCTGGCGGGGGGCTGGTCCAGCCTGGCGGT
		TCTCTCCGCCTGACCTGTGCGGCCTCAGGGTTCAC
		TTTCAGCCGGTACTGGATGACATGGGTGAGACAGG
		CCCCCGGCAAGGGACTGGAATGGGTAGCAAAGAT
		TAGGCACGACGGCGGTGAGAAATACTATCCCGAC
		AGTGTCAAGGGGCGGTTTACTGTCTCCCGAGATAA
		TGCCAAAAACTCACTCTACCTGCAGATGGATAATC
		TGCGAGCGGAGGATACTGCTATGTACTACTGTACT
		CGAGACTACAACAAGGACCTGTGGGGGCAGGGGA
		CACTGGTGACGGTTAGTTCTCGGGCGGCCGCAATT
		GAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGA
		GAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGG
		AAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACC
		TTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTG
		GAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG
		GCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAG
		CAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTC
		CCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAG
		CCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCG
		CTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC
		CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
		ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA
		TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
		ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG
		AAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
		GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGC

		GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
		TCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTC
		GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
65	V51 CAR	ATGGAACTGGGACTGTCATGGGTCTTTCTCGTGGC
	核酸序列	CATTCTCGAGGGGGTCCAGTGTGAGGTTCAGCTGG
		TGGAGAGCGGGGGGGGTCTGGTTCAGCCAGGTGG
		CAGTCTTAGGTTGTCATGTGCCGCGAGCGGGTTCA
		CGTTCTCACGATATTGGATGACCTGGGTTCGCCAG
		GCACCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCCAAGA
		TCAGGCACGACGGCGGAGAAAAATATTACGCGGA
		TTCCGTGAAAGGCAGATTCACAATCTCTAGGGATA
		ACGCCAAAAATTCCCTTTATCTTCAGATGAATAGC
		CTGAGGGCTGAAGACACTGCCGTGTACTACTGCAC
		GCGGGATTACAACAAAGATTATTGGGGCCAGGGA
		ACACTGGTGACCGTCAGCTCTCGGGCGGCCGCAAT
		TGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG
		AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGG
		GAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGAC
		CTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT
		GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT
		GGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGA
		GCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT
		CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCA
		GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATC
		GCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
		CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
		ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA
		TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
		ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG

		AAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
		GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
		GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
		TCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTC
		GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
66	V1-01 CAR	ATGGGCTGGTCTTGTATTATCTTGTTTCTCGTCGCA
	+ tEGFR	ACTGCTACAGGCGTTCATTCTGAAGTTCAACTCCA
	核酸序列	AGAATCTGGTCCTGGCCTGGTGAAACCTTCCGAAA
		CTCTCTCACTCACCTGTACCGTCTCAGGCGCTTCAA
		TATCACACTATTATTGGTCTTGGTTCCGGCAACCTG
		CAGGCAAAGGTCTCGAATGGATAGGCAGAATATA
		TCCCAGTGGAAGCACCTCCTATAATCCCTCTCTCA
		AGTCAAGAGTTGCAATGAGCGTTGACACACCCAA
		GAACCAATTCTCCCTCAAGCTGTCATCTGTAACTG
		CCGCCGATACTGCCGTTTACTACTGCGCTAGAGAT
		AGATCAACCGGATGGTCAGAATGGAATTCAGATCT
		GTGGGGACGGGGAACCCTCGTGACCGTATCTTCTC
		GGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCT
		TACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTA
		TCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCC
		CTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTG
		GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTT
		GCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
		GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTA
		CATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCC
		GCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGAC
		TTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG
		GAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
		AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAA

GAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG
AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGC
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGAT
TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG
CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCAC
CAAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCC
TGCCCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGC
CTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACC
CTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTG
CTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGAT
CCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTG
AATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAAT
ATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGG
CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTG
ACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGACCCACAG
GAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA
CAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAAC
AGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAAT
CATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTT
CTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTG
GGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAG
ATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTAT
GCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGA
CCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAG
AGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTC
TGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGG
CCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATG
TCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAA

		CCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAG
		AACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCT
		GCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGG
		GGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACAT
		TGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAG
		GAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAA
		GTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCC
		ATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGT
		CTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGCCTAAGATCCC
		GTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCT
		TGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTC
		ATG
67	V5 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGAACTGGGACTGTCTTGGGTGTTCCTGGTCGC
		TATATTGGAAGGAGTACAGTGCCAGGTCCAGCTCG
		TCGAGTCCGGGGGTGGCCTGGTGCAGCCCGGCGG
		CAGCCTCCGGCTGAGCTGCACAGCCTCAGGGTTTA
		CATTCAGCAGGTACTGGATGAGTTGGGTTAGGCAA
		GCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGGCCAAAA
		TCCGACATGATGGGGGCGAAAAGTACTATGTGGA
		TAGTGTGAAGGGACGGTTCACAATATCACGAGAC
		AATGCCAAAAACTCTTTGTACCTGCAAATGAACTC
		CCTGCGCGCCGAAGACACAGCTGTGTACTACTGCG
		CTACAGACTACACTAGGGACGTCTGGGGTCAAGG
		AACAGCCGTCACCGTGAGTAGTGCGGCCGCAATTG
		AAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAG
		AAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGA
		AACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTT
		CTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGA
		GTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC

CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCA
GGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCC
CGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCC
CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCT
CCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC
CGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC
GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATG
TTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT
GGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGA
AGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCG
AGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTT
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCG
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGA
AGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGC
TGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGCTT
CTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACC
ACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTGT
GTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCA
CTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAA
AAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCC
TGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACAT
ACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATATTCT
GAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTG
ATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCA
TGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGA
CCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTC
AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCT
CAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCA

		GGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAA
		ACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAA
		AACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGC
		TGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTG
		CTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGG
		GACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAG
		GGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGT
		GAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCA
		TACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATG
		AACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACT
		GTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCAC
		TGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAG
		AAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGC
		CGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCA
		CCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGT
		CCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCAC
		TGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGG
		TGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG
68	V36 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGAGCTGGGATTGTCCTGGGTTTTCCTGGTGGC
		TATACTCGAAGGCGTACAGTGTGAAGTGCAGTTGG
		TGGAGAGTGGCGGTGGCCTGGCCCAGCCGGGAGG
		CTCTTTGAGACTCTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCAC
		TTTCTCCCGCTATTGGATGACCTGGGTCCGGCAGG
		CGCCCGGCGGACGCCTGGAGTGGGTGGCTAAGAT
		CAAGTATGATGGATCAGAAAAATATTACGCAGAT
		AGCGTAAAAGGCCGGTTCACAATATCCAGGGATA
		ATGCAAAAAACTCCCTGTATCTGCAGATGGATAGC
		CTGCGCGCTGAAGACACCGCCGTATATTATTGCAC
		AAGAGACTACAATAAAGATTACTGGGGCCAGGGA

ACCCTGGTTACGGTGAGCTCACGGGCGGCCGCAAT
TGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGG
GAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGAC
CTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT
GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT
GGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGA
GCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT
CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCA
GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATC
GCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA
TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG
AAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
TCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTC
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGG
AAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAG
GCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGC
TTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTAC
CACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTG
TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCA
AAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATC
CTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACA
TACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATATTC

		TGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTG
		ATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCA
		TGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGA
		CCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTC
		AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCT
		CAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCA
		GGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAA
		ACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAA
		AACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGC
		TGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTG
		CTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGG
		GACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAG
		GGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGT
		GAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCA
		TACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATG
		AACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACT
		GTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCAC
		TGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAG
		AAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGC
		CGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCA
		CCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGT
		CCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCAC
		TGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGG
		TGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG
69	V48 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGAGCTGGGGCTTTCTTGGGTGTTTCTGGTAGC
		CATCCTCGAGGGAGTCCAGTGCGAGGTCCAGCTCG
		TCGAATCTGGCGGGGGGCTGGTCCAGCCTGGCGGT
		TCTCTCCGCCTGACCTGTGCGGCCTCAGGGTTCAC
		TTTCAGCCGGTACTGGATGACATGGGTGAGACAGG

CCCCCGGCAAGGGACTGGAATGGGTAGCAAAGAT
TAGGCACGACGGCGGTGAGAAATACTATCCCGAC
AGTGTCAAGGGGCGGTTTACTGTCTCCCGAGATAA
TGCCAAAAACTCACTCTACCTGCAGATGGATAATC
TGCGAGCGGAGGATACTGCTATGTACTACTGTACT
CGAGACTACAACAAGGACCTGTGGGGGCAGGGGA
CACTGGTGACGGTTAGTTCTCGGGCGGCCGCAATT
GAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGA
GAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGG
AAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACC
TTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTG
GAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG
GCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAG
CAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTC
CCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAG
CCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCG
CTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC
CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA
TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG
AAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
TCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTC
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGG
AAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAG
GCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGC
TTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTAC

CACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTG
TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCA
AAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATC
CTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACA
TACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATATTC
TGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTG
ATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCA
TGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGA
CCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTC
AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCT
CAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCA
GGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAA
ACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAA
AACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGC
TGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTG
CTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGG
GACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAG
GGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGT
GAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCA
TACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATG
AACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACT
GTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCAC
TGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAG
AAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGC
CGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCA
CCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGT
CCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCAC
TGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGG

TGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG

70	V51 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGAACTGGGACTGTCATGGGTCTTTCTCGTGGC CATTCTCGAGGGGGTCCAGTGTGAGGTTCAGCTGG TGGAGAGCGGGGGGGGGTCTGGTTCAGCCAGGTGG CAGTCTTAGGTTGTCATGTGCCGCGAGCGGGTTCA CGTTCTCACGATATTGGATGACCTGGGTTCGCCAG GCACCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCCAAGA TCAGGCACGACGGCGGAGAAAAATATTACGCGGA TTCCGTGAAAGGCAGATTCACAATCTCTAGGGATA ACGCCAAAAATTCCCTTTATCTTCAGATGAATAGC CTGAGGGCTGAAGACACTGCCGTGTACTACTGCAC GCGGGATTACAACAAAGATTATTGGGGCCAGGGA ACACTGGTGACCGTCAGCTCTCGGGCGGCCGCAAT TGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGG GAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGAC CTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT GGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGA GCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACT CCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCA GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATC GCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG AAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT

GGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
TCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTC
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGG
AAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAG
GCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGC
TTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTAC
CACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTG
TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCA
AAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATC
CTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACA
TACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATATTC
TGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTG
ATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCA
TGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGA
CCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTC
AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCT
CAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCA
GGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAA
ACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAA
AACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGC
TGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTG
CTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGG
GACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAG
GGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGT
GAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCA
TACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATG
AACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACT

GTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCAC
TGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAG
AAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGC
CGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCA
CCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGT
CCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCAC
TGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGG
TGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG

等效物

【0565】 在申請專利範圍中使用諸如「第一」、「第二」、「第三」等序數術語來修飾申請專利範圍要件本身，並不意味著某一申請專利範圍要件相對於另一個申請專利範圍要件的任何優先、先行或順序，或方法執行的時間順序，而僅作為標示，以將具有特定名稱的一個申請專利範圍要件與具有相同名稱(但使用該序數術語)的另一個要件區分開來，以區分各申請專利範圍要件。

【0566】 如本文在說明書和申請專利範圍中使用的冠詞「一(a)」和「一(an)」，除非明確指出相反，否則應理解為包括複數參考物。除非另有說明，否則若該群組之一個、多個或所有成員存在於、使用於或以其他方式相關於一特定產物或方法，則在一或多個群組成員之間包括「或」的申請專利範圍或描述被視為已滿足，除非上下文相反或以其他方式明顯指出。本發明包括其中該群組中恰好有一個成員存在於、使用於或以其他方式相關於特定的產品或過程的實施例。本發明亦包括其中大於一個或整個群組成員存在於、使用於或以其他方式相關於特定的產品或過程的實施例。此外，應當理解，本發明涵蓋所有變化、組合和排列，其中來自所列申請專利範圍的一或多個限制、要件、子句、描述性術語等，係引入另一從屬申請專利範圍中相同的基本申請專利範圍(或相關的任何其他申請專利範圍)中，除非另有說明或除非本領域普通技術人員可明顯看出矛盾或不一致。在要件以列表形式呈現的情況下(例如，以馬庫什組

(Markush group)或類似格式)，應當理解，亦揭示該要件的每個子群，且可從該群組中移除任一要件。應當理解，一般而言，本發明或本發明態樣被稱為包含特定要件、特徵等的情況下，本發明的某些實施例或本發明的各態樣由或基本上由此類要件、特徵等組成。為了簡單起見，在本文中這些實施例並未在每種情況下以如此多的詞語具體闡述。亦應當理解，本發明的任何實施例或態樣都可明確地從申請專利範圍中排除，而不論特定的排除是否在說明書中有陳述。用於描述本發明的背景並提供關於其實施的額外細節所引用的文獻、網站和其他參考資料均以引用方式併入本文中。

【序列表】

<110> 日商武田藥品工業股份有限公司/TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

<120> 鳥苷酸環化酶C (GCC)抗原結合劑之組成物及其使用方法

<130> MIL-005WO

<140> TW 110145784
<141> 2021-12-08

<150> US 63/123,331
<151> 2020-12-09

<160> 73

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 1
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser His Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 2
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 3
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 3
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 4
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 5
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 6
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 7
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 8
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 8
His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 9
Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 10
Arg Tyr Trp Met Thr
1 5

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 11
Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 12
Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 13
Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 14
Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 15
Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 16
Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 17
Asp Tyr Thr Arg Asp Val

1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 18
Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr
1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 19
Asp Tyr Asn Lys Asp Leu
1 5

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 20
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser His Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

Ala Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Lys Ile Arg Tyr Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 24
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gly Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 25
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 29
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
35

<210> 30
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 30
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 31

<211> 66
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 31
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60

Trp Val
65

<210> 32
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 32
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

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

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 33
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 34
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 34
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
65 70 75 80

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
85 90 95

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
100 105 110

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
115 120 125

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
130 135 140

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
145 150 155 160

Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
165 170 175

Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
180 185 190

His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
195 200 205

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
210 215

<210> 35
<211> 359
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 35
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met
130 135 140

Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile
145 150 155 160

His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro
165 170 175

Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
180 185 190

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
195 200 205

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
210 215 220

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
225 230 235 240

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
245 250 255

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
260 265 270

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
275 280 285

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
290 295 300

Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu
305 310 315 320

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
325 330 335

Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His

340 345 350

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 36
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 36
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val
65 70 75 80

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

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ala Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu

130 135 140

Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His
145 150 155 160

Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val
165 170 175

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
180 185 190

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
195 200 205

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
210 215 220

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
225 230 235 240

Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
245 250 255

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
260 265 270

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
275 280 285

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln
290 295 300

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
305 310 315 320

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr
325 330 335

Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
340 345 350

Arg

<210> 37
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 37
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln
20 25 30

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu
130 135 140

Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His
145 150 155 160

Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val
165 170 175

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
180 185 190

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
195 200 205

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
210 215 220

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
225 230 235 240

Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
245 250 255

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
260 265 270

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
275 280 285

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln
290 295 300

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
305 310 315 320

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr

325 330 335

Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
340 345 350

Arg

<210> 38
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 38
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu
130 135 140

Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His
145 150 155 160

Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val
165 170 175

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
180 185 190

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
195 200 205

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
210 215 220

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
225 230 235 240

Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
245 250 255

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
260 265 270

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
275 280 285

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln
290 295 300

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
305 310 315 320

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr
325 330 335

Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
340 345 350

Arg

<210> 39
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 39
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

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

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu
130 135 140

Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His
145 150 155 160

Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val
165 170 175

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
180 185 190

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
195 200 205

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
210 215 220

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
225 230 235 240

Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
245 250 255

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
260 265 270

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
275 280 285

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln
290 295 300

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

305 310 315 320

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr
325 330 335

Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
340 345 350

Arg

<210> 40
<211> 18
<212> PRT
<213> 大腸桿菌

<400> 40
Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 41
<211> 1073
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41
Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
35 40 45

Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
50 55 60

```
Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
65                  70                  75                  80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
                85                  90                  95

Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
            100                 105                 110

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
        115                 120                 125

Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
    130                 135                 140

Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
145                 150                 155                 160

Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
                165                 170                 175

Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
            180                 185                 190

Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
        195                 200                 205

Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
    210                 215                 220

Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
225                 230                 235                 240

Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
                245                 250                 255

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
```

260 265 270

Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
275 280 285

Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
290 295 300

Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
305 310 315 320

Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
325 330 335

Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
340 345 350

His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
355 360 365

Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
370 375 380

Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400

Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415

Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
420 425 430

Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
435 440 445

Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg
450 455 460

```
Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
465                 470                 475                 480

Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
                485                 490                 495

Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Asp Lys Lys Arg
            500                 505                 510

Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys
        515                 520                 525

Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Asn Leu
    530                 535                 540

Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
545                 550                 555                 560

Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
                565                 570                 575

Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser
            580                 585                 590

Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
        595                 600                 605

Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser
    610                 615                 620

Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro
625                 630                 635                 640

Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn
                645                 650                 655

Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu
```

660 665 670

Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg
675 680 685

Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe
690 695 700

Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val
705 710 715 720

Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro
725 730 735

Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe
740 745 750

His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu
755 760 765

Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln
770 775 780

Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu
785 790 795 800

Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu
805 810 815

Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly
820 825 830

Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met
835 840 845

Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp
850 855 860

```
Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly
865                 870                 875                 880

Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met
                885                 890                 895

Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu
            900                 905                 910

Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys
        915                 920                 925

Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly
    930                 935                 940

Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu
945                 950                 955                 960

Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu
                965                 970                 975

Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
            980                 985                 990

Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu  Thr Gly Met Lys Asp  Gln Lys Phe
        995                 1000                1005

Asn Leu  Pro Thr Pro Pro Thr  Val Glu Asn Gln Gln  Arg Leu Gln
    1010                1015                1020

Ala Glu  Phe Ser Asp Met Ile  Ala Asn Ser Leu Gln  Lys Arg Gln
    1025                1030                1035

Ala Ala  Gly Ile Arg Ser Gln  Lys Pro Arg Arg Val  Ala Ser Tyr
    1040                1045                1050

Lys Lys  Gly Thr Leu Glu Tyr  Leu Gln Leu Asn Thr  Thr Asp Lys
```

1055 1060 1065

Glu Ser Thr Tyr Phe
1070

<210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 42
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 43
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 43
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
50 55 60

```
Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
65                  70                  75                  80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
                85                  90                  95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
            100                 105                 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
        115                 120                 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
    130                 135                 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145                 150                 155                 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
                165                 170                 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
            180                 185                 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
        195                 200                 205

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
    210                 215                 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
225                 230                 235                 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
                245                 250                 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
```

260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
325 330 335

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
340 345 350

Ile Gly Leu Phe Met
355

<210> 44
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 44
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 45
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 45
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 46
<211> 359
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 46
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met
130 135 140

Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile
145 150 155 160

His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro
165 170 175

Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
180 185 190

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
195 200 205

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
210 215 220

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
225 230 235 240

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
245 250 255

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
260 265 270

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
275 280 285

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
290 295 300

Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu

305 310 315 320

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
325 330 335

Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His
340 345 350

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 47
<211> 363
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 47
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala
130 135 140

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
145 150 155 160

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
275 280 285

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
290 295 300

Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320

Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335

His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360

<210> 48
<211> 363
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala
130 135 140

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
145 150 155 160

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
275 280 285

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn

290 295 300

Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320

Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335

His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360

<210> 49
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 49
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ala Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 50
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 50
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln
20 25 30

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
    130                 135                 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145                 150                 155                 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
                165                 170                 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
    210                 215                 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225                 230                 235                 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
                245                 250                 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
            260                 265                 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
```

275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 51
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 51
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro

65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 52
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 52
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

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

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

```
Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala
65                  70                  75                  80

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

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
    130                 135                 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145                 150                 155                 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
                165                 170                 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
    210                 215                 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225                 230                 235                 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
                245                 250                 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
```

260 265 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 53
Arg Ala Ala Ala
1

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 54
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 55
<211> 742
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 55
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala
130 135 140

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
145 150 155 160

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
275 280 285

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
290 295 300

Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320

Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335

His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe

340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr
355 360 365

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
370 375 380

Pro Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His
385 390 395 400

Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile
405 410 415

Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His
420 425 430

Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val
435 440 445

Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln
450 455 460

Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu
465 470 475 480

Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn
485 490 495

Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu
500 505 510

Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys
515 520 525

Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys
530 535 540

Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln
545 550 555 560

Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr
565 570 575

Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro
580 585 590

Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu
595 600 605

Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val
610 615 620

Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala
625 630 635 640

Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys
645 650 655

Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly
660 665 670

Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly
675 680 685

His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly
690 695 700

Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile
705 710 715 720

Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu
725 730 735

Gly Ile Gly Leu Phe Met

740

<210> 56
<211> 742
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 56

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                  10                  15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
        35                  40                  45

Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
                85                  90                  95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
        115                 120                 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala
    130                 135                 140

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
```

145 150 155 160

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
275 280 285

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
290 295 300

Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320

Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335

His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr
355 360 365

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
370 375 380

Pro Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His
385 390 395 400

Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile
405 410 415

Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His
420 425 430

Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val
435 440 445

Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln
450 455 460

Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu
465 470 475 480

Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn
485 490 495

Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu
500 505 510

Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys
515 520 525

Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys
530 535 540

Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln

545 550 555 560

Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr
565 570 575

Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro
580 585 590

Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu
595 600 605

Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val
610 615 620

Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala
625 630 635 640

Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys
645 650 655

Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly
660 665 670

Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly
675 680 685

His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly
690 695 700

Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile
705 710 715 720

Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu
725 730 735

Gly Ile Gly Leu Phe Met
740

<210> 57
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 57
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val
65 70 75 80

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

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ala Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys

355 360 365

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380

Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400

Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser
405 410 415

Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430

Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
435 440 445

Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
450 455 460

Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
465 470 475 480

Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
485 490 495

Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
515 520 525

Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn
530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
565 570 575

Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val
580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr
625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670

Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700

Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 58
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 58

```
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1               5                  10                  15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln
            20                  25                  30

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala
65                  70                  75                  80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
    130                 135                 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145                 150                 155                 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
                165                 170                 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
```

180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
355 360 365

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380

Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400

Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser
405 410 415

Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430

Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
435 440 445

Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
450 455 460

Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
465 470 475 480

Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
485 490 495

Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
515 520 525

Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn
530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
565 570 575

Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val

580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr
625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670

Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700

Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 59
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 59
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
355 360 365

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380

Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400

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

405 410 415

Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430

Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
435 440 445

Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
450 455 460

Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
465 470 475 480

Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
485 490 495

Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
515 520 525

Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn
530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
565 570 575

Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val
580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr
625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670

Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700

Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 60
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 60
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

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

```
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45

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

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala
65                  70                  75                  80

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

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
    130                 135                 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145                 150                 155                 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
                165                 170                 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
    210                 215                 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
```

225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
355 360 365

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380

Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400

Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser
405 410 415

Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430

Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
435 440 445

Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
450 455 460

Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
465 470 475 480

Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
485 490 495

Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
515 520 525

Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn
530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
565 570 575

Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val
580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr

625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670

Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685

His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700

Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 61
<211> 1089
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 61
atgggctggt cttgtattat cttgtttctc gtcgcaactg ctacaggcgt tcattctgaa 60

gttcaactcc aagaatctgg tcctggcctg gtgaaacctt ccgaaactct ctcactcacc 120

tgtaccgtct caggcgcttc aatatcacac tattattggt cttggttccg gcaacctgca 180

ggcaaaggtc tcgaatggat aggcagaata tatcccagtg gaagcacctc ctataatccc 240

tctctcaagt caagagttgc aatgagcgtt gacacaccca agaaccaatt ctccctcaag 300

ctgtcatctg taactgccgc cgatactgcc gtttactact gcgctagaga tagatcaacc 360

ggatggtcag aatggaattc agatctgtgg ggacggggaa ccctcgtgac cgtatcttct 420

cgggcggccg caattgaagt tatgtatcct cctccttacc tagacaatga gaagagcaat 480

ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac ctttgtccaa gtcccctatt tcccggacct 540

tctaagccct tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600

gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 660

gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat 720

gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagagtga agttcagcag gagcgcagac 780

gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 840

gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 900

agaaggaaga accctcagga aggcctgttc aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 960

gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1020

ttccagggtc tcagtacagc caccaaggac accttcgacg cccttcacat gcaggccctg 1080

cccctcgc 1089

<210> 62
<211> 1074
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 62
atggaactgg gactgtcttg ggtgttcctg gtcgctatat tggaaggagt acagtgccag 60

gtccagctcg tcgagtccgg gggtggcctg gtgcagcccg gcggcagcct ccggctgagc 120

tgcacagcct cagggtttac attcagcagg tactggatga gttgggttag gcaagccccc 180

ggcaaaggcc tggagtgggt ggccaaaatc cgacatgatg ggggcgaaaa gtactatgtg 240

gatagtgtga agggacggtt cacaatatca cgagacaatg ccaaaaactc tttgtacctg 300

caaatgaact ccctgcgcgc cgaagacaca gctgtgtact actgcgctac agactacact 360

agggacgtct ggggtcaagg aacagccgtc accgtgagta gtcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaaggggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg ctaa 1074

<210> 63
<211> 1071
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 63
atggagctgg gattgtcctg ggttttcctg gtggctatac tcgaaggcgt acagtgtgaa 60

gtgcagttgg tggagagtgg cggtggcctg gcccagccgg gaggctcttt gagactctcc 120

tgcgctgcct ccggcttcac tttctcccgc tattggatga cctgggtccg gcaggcgccc 180

ggcggacgcc tggagtgggt ggctaagatc aagtatgatg gatcagaaaa atattacgca 240

gatagcgtaa aaggccggtt cacaatatcc agggataatg caaaaaactc cctgtatctg 300

cagatggata gcctgcgcgc tgaagacacc gccgtatatt attgcacaag agactacaat 360

aaagattact ggggccaggg aaccctggtt acggtgagct cacgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaaggggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg c 1071

<210> 64
<211> 1071
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 64
atggagctgg ggctttcttg ggtgtttctg gtagccatcc tcgagggagt ccagtgcgag 60

gtccagctcg tcgaatctgg cgggggggctg gtccagcctg gcggttctct ccgcctgacc 120

tgtgcggcct cagggttcac tttcagccgg tactggatga catgggtgag acaggccccc 180

ggcaagggac tggaatgggt agcaaagatt aggcacgacg gcggtgagaa atactatccc 240

gacagtgtca aggggcggtt tactgtctcc cgagataatg ccaaaaactc actctacctg 300

cagatggata atctgcgagc ggaggatact gctatgtact actgtactcg agactacaac 360

aaggacctgt gggggcaggg gacactggtg acggttagtt ctcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg c 1071

<210> 65
<211> 1071
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 65
atggaactgg gactgtcatg ggtctttctc gtggccattc tcgaggggggt ccagtgtgag 60

gttcagctgg tggagagcgg ggggggtctg gttcagccag gtggcagtct taggttgtca 120

tgtgccgcga gcgggttcac gttctcacga tattggatga cctgggttcg ccaggcacca 180

gggaaggggc tggagtgggt cgccaagatc aggcacgacg gcggagaaaa atattacgcg 240

gattccgtga aaggcagatt cacaatctct agggataacg ccaaaaattc cctttatctt 300

cagatgaata gcctgagggc tgaagacact gccgtgtact actgcacgcg ggattacaac 360

aaagattatt ggggccaggg aacactggtg accgtcagct ctcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg c 1071

<210> 66
<211> 2226
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 66
atgggctggt cttgtattat cttgtttctc gtcgcaactg ctacaggcgt tcattctgaa 60

gttcaactcc aagaatctgg tcctggcctg gtgaaacctt ccgaaactct ctcactcacc 120

tgtaccgtct caggcgcttc aatatcacac tattattggt cttggttccg gcaacctgca 180

ggcaaaggtc tcgaatggat aggcagaata tatcccagtg gaagcacctc ctataatccc 240

tctctcaagt caagagttgc aatgagcgtt gacacaccca agaaccaatt ctccctcaag 300

ctgtcatctg taactgccgc cgatactgcc gtttactact gcgctagaga tagatcaacc 360

ggatggtcag aatggaattc agatctgtgg ggacggggaa ccctcgtgac cgtatcttct 420

cgggcggccg caattgaagt tatgtatcct cctccttacc tagacaatga gaagagcaat 480

ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac ctttgtccaa gtcccctatt tcccggacct 540

tctaagccct tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600

gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 660

gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat 720

gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagagtga agttcagcag gagcgcagac 780

gcccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 840

gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 900

agaaggaaga accctcagga aggcctgttc aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 960

gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1020

ttccagggtc tcagtacagc caccaaggac accttcgacg cccttcacat gcaggccctg 1080

ccccctcgcg gaagcggagc tactaacttc agcctgctga agcaggctgg agacgtggag 1140

gagaaccctg gacccatgct tctcctggtg acaagccttc tgctctgtga gttaccacac 1200

ccagcattcc tcctgatccc acgcaaagtg tgtaacggaa taggtattgg tgaatttaaa 1260

gactcactct ccataaatgc tacgaatatt aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt 1320

ggcgatctcc acatcctgcc ggtggcattt aggggtgact ccttcacaca tactcctcct 1380

ctggacccac aggaactgga tattctgaaa accgtaaagg aaatcacagg gtttttgctg 1440

attcaggctt ggcctgaaaa caggacggac ctccatgcct ttgagaacct agaaatcata 1500

cgcggcagga ccaagcaaca tggtcagttt tctcttgcag tcgtcagcct gaacataaca 1560

tccttgggat tacgctccct caaggagata agtgatggag atgtgataat ttcaggaaac 1620

aaaaatttgt gctatgcaaa tacaataaac tggaaaaaac tgtttgggac ctccggtcag 1680

aaaaccaaaa ttataagcaa cagaggtgaa aacagctgca aggccacagg ccaggtctgc 1740

catgccttgt gctcccccga gggctgctgg ggcccggagc ccagggactg cgtctcttgc 1800

cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg gacaagtgca accttctgga gggtgagcca 1860

agggagtttg tggagaactc tgagtgcata cagtgccacc cagagtgcct gcctcaggcc 1920

atgaacatca cctgcacagg acggggacca gacaactgta tccagtgtgc ccactacatt 1980

gacggccccc actgcgtcaa gacctgcccg gcaggagtca tgggagaaaa caacaccctg 2040

gtctggaagt acgcagacgc cggccatgtg tgccacctgt gccatccaaa ctgcacctac 2100

ggatgcactg ggccaggtct tgaaggctgt cccacgaatg ggcctaagat cccgtccatc 2160

gccactggga tggtgggggc cctcctcttg ctgctggtgg tggccctggg gatcggcctc 2220

ttcatg 2226

<210> 67
<211> 2205
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 67
atggaactgg gactgtcttg ggtgttcctg gtcgctatat tggaaggagt acagtgccag 60

gtccagctcg tcgagtccgg gggtggcctg gtgcagcccg gcggcagcct ccggctgagc 120

tgcacagcct cagggtttac attcagcagg tactggatga gttgggttag gcaagccccc 180

ggcaaaggcc tggagtgggt ggccaaaatc cgacatgatg ggggcgaaaa gtactatgtg 240

gatagtgtga agggacggtt cacaatatca cgagacaatg ccaaaaactc tttgtacctg 300

caaatgaact ccctgcgcgc cgaagacaca gctgtgtact actgcgctac agactacact 360

agggacgtct ggggtcaagg aacagccgtc accgtgagta gtgcggccgc aattgaagtt 420

atgtatcctc ctccttacct agacaatgag aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa 480

gggaaacacc tttgtccaag tcccctattt cccggacctt ctaagccctt ttgggtgctg 540

gtggtggttg gtggagtcct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc ctttattatt 600

ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc 660

cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca 720

gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc 780

cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 840

aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 900

ggcctgttca atgaactgca gaaagataag atggcggagg ccttcagtga gattgggatg 960

aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt tccagggtct cagtacagcc 1020

accaaggaca ccttcgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcgg aagcggagct 1080

actaacttca gcctgctgaa gcaggctgga gacgtggagg agaaccctgg acccatgctt 1140

ctcctggtga caagccttct gctctgtgag ttaccacacc cagcattcct cctgatccca 1200

cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 1260

acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg 1320

gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctcctc tggacccaca ggaactggat 1380

attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac 1440

aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat 1500

ggtcagtttt ctcttgcagt cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc 1560

aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat 1620

acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaaat tataagcaac 1680

agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag 1740

ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg 1800

gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct 1860

gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga 1920

cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggcccccа ctgcgtcaag 1980

acctgcccgg caggagtcat gggagaaaac aacaccctgg tctggaagta cgcagacgcc 2040

ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt 2100

gaaggctgtc ccacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg ccactgggat ggtgggggcc 2160

ctcctcttgc tgctggtggt ggccctgggg atcggcctct tcatg 2205

<210> 68
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 68
atggagctgg gattgtcctg ggttttcctg gtggctatac tcgaaggcgt acagtgtgaa 60

gtgcagttgg tggagagtgg cggtggcctg gcccagccgg gaggctcttt gagactctcc 120

tgcgctgcct ccggcttcac tttctcccgc tattggatga cctgggtccg gcaggcgccc 180

ggcggacgcc tggagtgggt ggctaagatc aagtatgatg gatcagaaaa atattacgca 240

gatagcgtaa aaggccggtt cacaatatcc agggataatg caaaaaactc cctgtatctg 300

cagatggata gcctgcgcgc tgaagacacc gccgtatatt attgcacaag agactacaat 360

aaagattact ggggccaggg aaccctggtt acggtgagct cacgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080

gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140

cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200

ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260

gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320

ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380

gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440

aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500

catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560

ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620

aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680

aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740

gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800

agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860

tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920

ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980

aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040

gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100

cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160

gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 69
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 69
atggagctgg ggctttcttg ggtgtttctg gtagccatcc tcgagggagt ccagtgcgag 60

gtccagctcg tcgaatctgg cgggggggctg gtccagcctg gcggttctct ccgcctgacc 120

tgtgcggcct cagggttcac tttcagccgg tactggatga catgggtgag acaggccccc 180

ggcaagggac tggaatgggt agcaaagatt aggcacgacg gcggtgagaa atactatccc 240

gacagtgtca aggggcggtt tactgtctcc cgagataatg ccaaaaactc actctacctg 300

cagatggata atctgcgagc ggaggatact gctatgtact actgtactcg agactacaac 360

aaggacctgt gggggcaggg gacactggtg acggttagtt ctcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccgggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080

gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140

cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200

ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260

gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320

ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380

gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440

aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500

catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560

ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620

aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680

aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740

gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800

agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860

tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920

ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980

aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040

gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100

cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160

gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 70
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多核苷酸"

<400> 70
atggaactgg gactgtcatg ggtctttctc gtggccattc tcgaggggggt ccagtgtgag 60

gttcagctgg tggagagcgg ggggggtctg gttcagccag gtggcagtct taggttgtca 120

tgtgccgcga gcgggttcac gttctcacga tattggatga cctgggttcg ccaggcacca 180

gggaaggggc tggagtgggt cgccaagatc aggcacgacg gcggagaaaa atattacgcg 240

gattccgtga aaggcagatt cacaatctct agggataacg ccaaaaattc cctttatctt 300

cagatgaata gcctgagggc tgaagacact gccgtgtact actgcacgcg ggattacaac 360

aaagattatt ggggccaggg aacactggtg accgtcagct ctcgggcggc cgcaattgaa 420

gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccccgc gtaccagcag 780

ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840

gacaagagac gtggccgggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900

gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960

atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020

gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080

gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140

cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200

ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260

gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320

ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380

gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440

aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500

catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560

ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620

aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680

aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740

gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800

agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860

tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920

ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980

aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040

gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100

cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160

gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 71
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 71
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 72
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成多肽"

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(30)
<223> /說明="此序列可包含1-6個'Gly Gly Gly Gly Ser'重複單元"

<400> 72
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

<210> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /說明="人工序列之描述：合成肽"

<400> 73
Arg Gly Asp Ser
1

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗鳥苷酸環化酶C (GCC)嵌合抗原受體(CAR)，其包含一與鳥苷酸環化酶C (GCC)結合之細胞外抗原結合域、一跨膜域、及至少一細胞內信號傳導域。

【請求項2】 如請求項0所述之抗GCC CAR，其中該抗原結合域包含

一重鏈可變區(V_H)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8)、RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11)和 DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16)；

一重鏈可變區(V_H)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9)、KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12)和 DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17)；

一重鏈可變區(V_H)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)；

一重鏈可變區(V_H)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14)和 DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19)；或

一重鏈可變區(V_H)，其具有下列互補決定區(CDR)序列：RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10)、KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15)和 DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18)。

【請求項3】 如請求項1所述之抗GCC CAR，其中該抗原結合域包含一重鏈可變區(VH)，其與SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 20至少90%一致。

【請求項4】 如請求項0所述之抗GCC CAR，其中該抗原結合域包含

一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 21 至少90%一致的胺基酸序列；

一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 26 至少90%一致的胺基酸序列；

一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 27 至少90%一致的胺基酸序列；或

一免疫球蛋白重鏈可變(VH)區，其包含一與 SEQ ID NO: 28 至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR，其中該抗原結合域包含一僅具抗GCC抗原結合域之免疫球蛋白可變重鏈。

【請求項6】 如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR，其中，該細胞外抗GCC抗原結合域前接有一編碼前導胜肽之前導核苷酸序列。

【請求項7】 如請求項28所述之抗GCC CAR，其中該前導胜肽包含SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、或SEQ ID NO: 42。

【請求項8】 如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR，其更包含一鉸鏈域。

【請求項9】 如請求項0，其中該鉸鏈域包含一CD28之鉸鏈域。

【請求項10】 如請求項0所述之抗GCC CAR，其中該CD28鉸鏈域包含SEQ ID NO: 29。

【請求項11】 如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR，其中該鉸鏈域與該跨膜域融合。

【請求項12】 如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR，其中該跨膜域包含一蛋白質跨膜域，該蛋白質選自於T細胞受體、CD8、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、

CD83、CD86、CD134、CD137、CD154和TNFRSF19之α、β或ζ鏈，及其任一組合。

【請求項13】 如請求項0所述之抗GCC CAR，其中該跨膜域包含一CD28跨膜域。

【請求項14】 如請求項0所述之抗GCC CAR，其中該CD28跨膜域包含SEQ ID NO: 30。

【請求項15】 如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR，其中該至少一細胞內信號傳導域包含一共刺激域和一初級信號傳導域。

【請求項16】 如請求項 0所述之抗GCC CAR，其中該共刺激域包含OX40、CD70 、 CD27 、 CD28 、 CD5 、 ICAM-1 、 LFA-1 (CD11a/CD18) 、 ICOS (CD278)、DAP10、DAP12、和4-1BB (CD137)的功能性信號傳導域，或其任一組合。

【請求項17】 如請求項0所述之抗GCC CAR，其中該共刺激域包含一CD28的功能性信號傳導域。

【請求項18】 如請求項0所述之抗GCC CAR，其中該CD28共刺激域包含SEQ ID NO: 32。

【請求項19】 如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR，其中該初級信號傳導域包含一CD3ζ信號傳導域。

【請求項20】 如請求項0之抗GCC CAR，其中，該CD3ζ信號傳導域包含SEQ ID NO: 33。

【請求項21】 一種抗GCC CAR，其包含一選自由以下組成之序列：SEQ ID NO: 47-52。

【請求項22】 一種經分離聚核苷酸，其編碼如請求項0至0中任一項所述之抗

GCC CAR。

【請求項23】 如請求項0所述之經分離聚核苷酸，其更包含經截短之表皮生長因子受體(tEGFR)序列。

【請求項24】 如請求項0所述之經分離聚核苷酸，其中該tEGFR包含一核苷酸序列，其編碼與SEQ ID NO: 43至少95%、96%、97%、98%、99%一致的胺基酸序列。

【請求項25】 如請求項0所述之經分離聚核苷酸，其中該tEGFR包含一核苷酸序列，其編碼與SEQ ID NO: 43一致的胺基酸序列。

【請求項26】 如請求項0至0中任一項所述之經分離聚核甘酸，其更包含一弗林蛋白酶識別位點和下游2A自裂解胜肽序列，設計用於該標籤序列和CAR序列的同時雙順反子表現。

【請求項27】 如請求項0所述之經分離聚核甘酸，其中該2A自裂解胜肽係選自於F2A、P2A、E2A及T2A。

【請求項28】 如請求項0所述之經分離聚核苷酸，其中該2A自裂解胜肽為P2A。

【請求項29】 一種載體，其包含如請求項0至0中任一項所述之經分離聚核苷酸。

【請求項30】 如請求項0所述之載體，其中該載體為腺病毒載體、腺病毒相關載體、DNA載體、慢病毒載體、質體、逆轉錄病毒載體或RNA載體。

【請求項31】 一種細胞，其包含如請求項0或0所述之載體。

【請求項32】 如請求項0所述之細胞，其中該細胞為T細胞、同種異體T細胞、自體T細胞或腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。

【請求項33】 一種細胞群，其包含如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR

或請求項0至0中任一項所述之核酸。

【請求項34】 一種套組，其包含如請求項0所述之細胞群。

【請求項35】 一種醫藥組成物，其包含如請求項0或0所述之細胞群。

【請求項36】 如請求項0所述之醫藥組成物，其中該群體中大於70%、80%、90%或95%的細胞表現該抗GCC CAR。

【請求項37】 一種治療癌症之方法，其包含向有需要治療之個體投與包含如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR之醫藥組成物或細胞群。

【請求項38】 如請求項0所述之方法，其中該癌症係選自於胃腸癌、大腸直腸癌、大腸直腸腺癌、大腸直腸平滑肌肉瘤、大腸直腸淋巴瘤、大腸直腸黑色素瘤、大腸直腸神經內分泌腫瘤、轉移性大腸癌、胃癌、胃腺癌、胃淋巴瘤、胃肉瘤、食道癌、鱗狀細胞癌、食道腺癌或胰臟癌。

【請求項39】 如請求項**錯誤! 找不到參照來源。**所述之方法，其中該癌症為胃腸癌。

【請求項40】 如請求項0所述之方法，其中該胃腸癌為大腸癌、大腸直腸癌、胃癌或食道癌。

【請求項41】 一種降低腫瘤生長或腫瘤大小之方法，其包含向有需要治療之個體投與包含如請求項0至0中任一項所述之抗GCC CAR之醫藥組成物或細胞群。

【發明圖式】

牛黃化膠溶液(1分)
圖式(2D)

牛黃化膠溶液(1分)
圖式(2C)

牛黃化膠溶液(1分)
圖式(2A)

牛黃化膠溶液(1分)
圖式(2B)

VDD
VSS
VSS
VSS
VDD
PMOS
NMOS
GND
VDD
時間[ns]
電流[mA]
圖3C

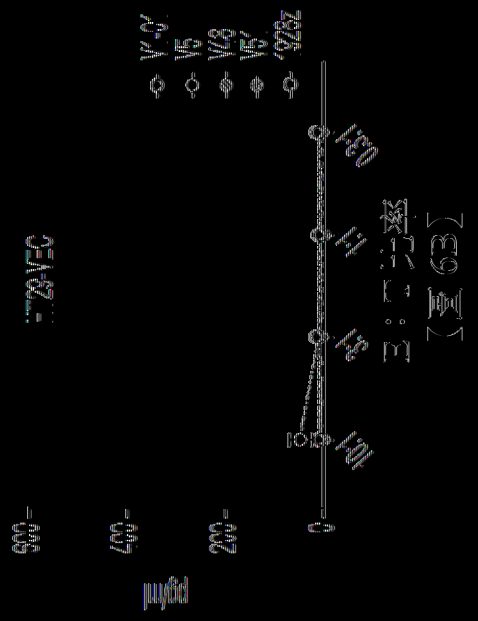
VDD
VSS
VSS
VSS
VDD
PMOS
NMOS
GND
VDD
時間[ns]
電流[mA]
圖3C

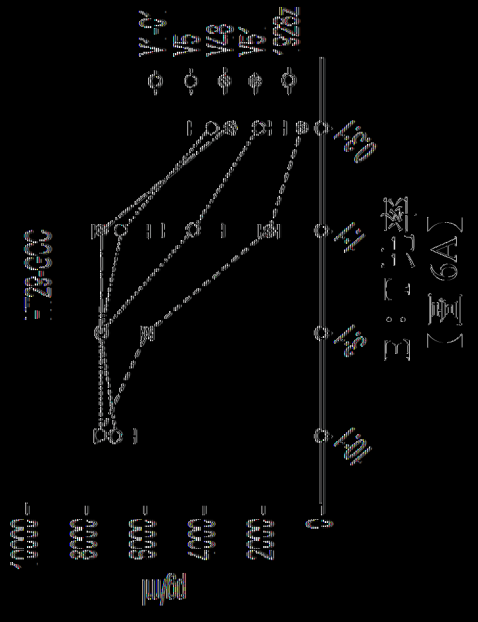
VDD
VSS
VSS
VSS
VDD
PMOS
NMOS
GND
VDD
時間[ns]
電流[mA]
圖3A

VDD
VSS
VSS
VSS
VDD
PMOS
NMOS
GND
VDD
時間[ns]
電流[mA]
圖3C

圖式
圖 7A
圖 7B
圖 7C
圖 7D
ppm
Vout
Vss
Vdd

V-V
V5
V8
V22
pg/ml
0
圖 5B
V-V
V5
V8
V22
pg/ml
0
圖 5D
V-V
V5
V8
V22
pg/ml
0
圖 5A
V-V
V5
V8
V22
pg/ml
0
圖 5C


【圖6】
ppm
V1
V2
V3
V4
V5
V6
V7
V8
V9
V10
V11
V12
V13
V14
V15
V16
V17
V18
V19
V20
V21
V22
V23
V24
V25
V26
V27
V28
V29
V30
V31
V32
V33
V34
V35
V36
V37
V38
V39
V40
V41
V42
V43
V44
V45
V46
V47
V48
V49
V50
V51
V52
V53
V54
V55
V56
V57
V58
V59
V60
V61
V62
V63
V64
V65
V66
V67
V68
V69
V70
V71
V72
V73
V74
V75
V76
V77
V78
V79
V80
V81
V82
V83
V84
V85
V86
V87
V88
V89
V90
V91
V92
V93
V94
V95
V96
V97
V98
V99
V100
V101
V102
V103
V104
V105
V106
V107
V108
V109
V110
V111
V112
V113
V114
V115
V116
V117
V118
V119
V120
V121
V122
V123
V124
V125
V126
V127
V128
V129
V130
V131
V132
V133
V134
V135
V136
V137
V138
V139
V140
V141
V142
V143
V144
V145
V146
V147
V148
V149
V150
V151
V152
V153
V154
V155
V156
V157
V158
V159
V160
V161
V162
V163
V164
V165
V166
V167
V168
V169
V170
V171
V172
V173
V174
V175
V176
V177
V178
V179
V180
V181
V182
V183
V184
V185
V186
V187
V188
V189
V190
V191
V192
V193
V194
V195
V196
V197
V198
V199
V200
V201
V202
V203
V204
V205
V206
V207
V208
V209
V210
V211
V212
V213
V214
V215
V216
V217
V218
V219
V220
V221
V222
V223
V224
V225
V226
V227
V228
V229
V230
V231
V232
V233
V234
V235
V236
V237
V238
V239
V240
V241
V242
V243
V244
V245
V246
V247
V248
V249
V250
V251
V252
V253
V254
V255
V256
V257
V258
V259
V260
V261
V262
V263
V264
V265
V266
V267
V268
V269
V270
V271
V272
V273
V274
V275
V276
V277
V278
V279
V280
V281
V282
V283
V284
V285
V286
V287
V288
V289
V290
V291
V292
V293
V294
V295
V296
V297
V298
V299
V300
V301
V302
V303
V304
V305
V306
V307
V308
V309
V310
V311
V312
V313
V314
V315
V316
V317
V318
V319
V320
V321
V322
V323
V324
V325
V326
V327
V328
V329
V330
V331
V332
V333
V334
V335
V336
V337
V338
V339
V340
V341
V342
V343
V344
V345
V346
V347
V348
V349
V350
V351
V352
V353
V354
V355
V356
V357
V358
V359
V360
V361
V362
V363
V364
V365
V366
V367
V368
V369
V370
V371
V372
V373
V374
V375
V376
V377
V378
V379
V380
V381
V382
V383
V384
V385
V386
V387
V388
V389
V390
V391
V392
V393
V394
V395
V396
V397
V398
V399
V400
V401
V402
V403
V404
V405
V406
V407
V408
V409
V410
V411
V412
V413
V414
V415
V416
V417
V418
V419
V420
V421
V422
V423
V424
V425
V426
V427
V428
V429
V430
V431
V432
V433
V434
V435
V436
V437
V438
V439
V440
V441
V442
V443
V444
V445
V446
V447
V448
V449
V450
V451
V452
V453
V454
V455
V456
V457
V458
V459
V460
V461
V462
V463
V464
V465
V466
V467
V468
V469
V470
V471
V472
V473
V474
V475
V476
V477
V478
V479
V480
V481
V482
V483
V484
V485
V486
V487
V488
V489
V490
V491
V492
V493
V494
V495
V496
V497
V498
V499
V500
V501
V502
V503
V504
V505
V506
V507
V508
V509
V510
V511
V512
V513
V514
V515
V516
V517
V518
V519
V520
V521
V522
V523
V524
V525
V526
V527
V528
V529
V530
V531
V532
V533
V534
V535
V536
V537
V538
V539
V540
V541
V542
V543
V544
V545
V546
V547
V548
V549
V550
V551
V552
V553
V554
V555
V556
V557
V558
V559
V560
V561
V562
V563
V564
V565
V566
V567
V568
V569
V570
V571
V572
V573
V574
V575
V576
V577
V578
V579
V580
V581
V582
V583
V584
V585
V586
V587
V588
V589
V590
V591
V592
V593
V594
V595
V596
V597
V598
V599
V600
V601
V602
V603
V604
V605
V606
V607
V608
V609
V610
V611
V612
V613
V614
V615
V616
V617
V618
V619
V620
V621
V622
V623
V624
V625
V626
V627
V628
V629
V630
V631
V632
V633
V634
V635
V636
V637
V638
V639
V640
V641
V642
V643
V644
V645
V646
V647
V648
V649
V650
V651
V652
V653
V654
V655
V656
V657
V658
V659
V660
V661
V662
V663
V664
V665
V666
V667
V668
V669
V670
V671
V672
V673
V674
V675
V676
V677
V678
V679
V680
V681
V682
V683
V684
V685
V686
V687
V688
V689
V690
V691
V692
V693
V694
V695
V696
V697
V698
V699
V700
V701
V702
V703
V704
V705
V706
V707
V708
V709
V710
V711
V712
V713
V714
V715
V716
V717
V718
V719
V720
V721
V722
V723
V724
V725
V726
V727
V728
V729
V730
V731
V732
V733
V734
V735
V736
V737
V738
V739
V740
V741
V742
V743
V744
V745
V746
V747
V748
V749
V750
V751
V752
V753
V754
V755
V756
V757
V758
V759
V760
V761
V762
V763
V764
V765
V766
V767
V768
V769
V770
V771
V772
V773
V774
V775
V776
V777
V778
V779
V780
V781
V782
V783
V784
V785
V786
V787
V788
V789
V790
V791
V792
V793
V794
V795
V796
V797
V798
V799
V800
V801
V802
V803
V804
V805
V806
V807
V808
V809
V810
V811
V812
V813
V814
V815
V816
V817
V818
V819
V820
V821
V822
V823
V824
V825
V826
V827
V828
V829
V830
V831
V832
V833
V834
V835
V836
V837
V838
V839
V840
V841
V842
V843
V844
V845
V846
V847
V848
V849
V850
V851
V852
V853
V854
V855
V856
V857
V858
V859
V860
V861
V862
V863
V864
V865
V866
V867
V868
V869
V870
V871
V872
V873
V874
V875
V876
V877
V878
V879
V880
V881
V882
V883
V884
V885
V886
V887
V888
V889
V890
V891
V892
V893
V894
V895
V896
V897
V898
V899
V900
V901
V902
V903
V904
V905
V906
V907
V908
V909
V910
V911
V912
V913
V914
V915
V916
V917
V918
V919
V920
V921
V922
V923
V924
V925
V926
V927
V928
V929
V930
V931
V932
V933
V934
V935
V936
V937
V938
V939
V940
V941
V942
V943
V944
V945
V946
V947
V948
V949
V950
V951
V952
V953
V954
V955
V956
V957
V958
V959
V960
V961
V962
V963
V964
V965
V966
V967
V968
V969
V970
V971
V972
V973
V974
V975
V976
V977
V978
V979
V980
V981
V982
V983
V984
V985
V986
V987
V988
V989
V990
V991
V992
V993
V994
V995
V996
V997
V998
V999
V1000

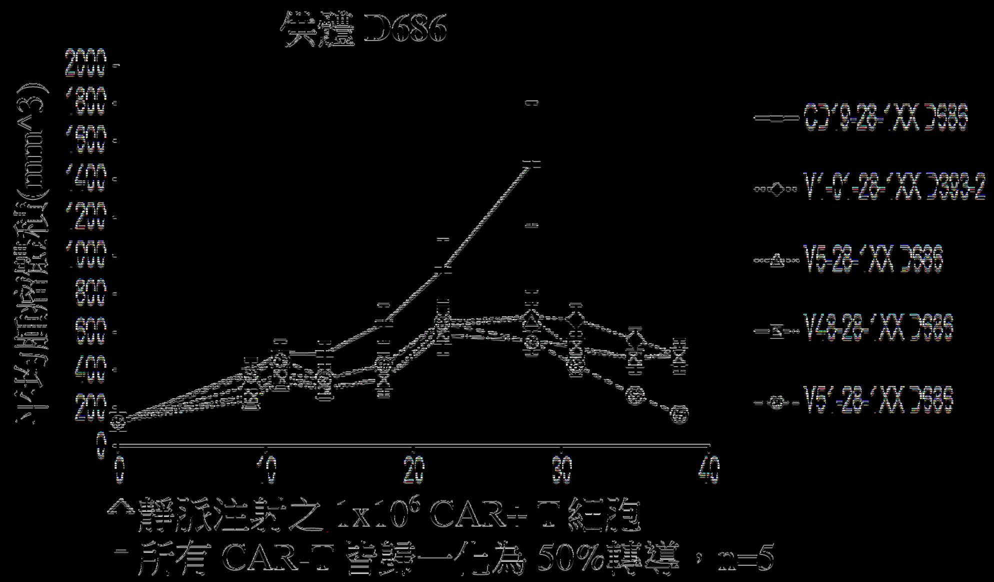

【圖5】
ppm
V1
V2
V3
V4
V5
V6
V7
V8
V9
V10
V11
V12
V13
V14
V15
V16
V17
V18
V19
V20
V21
V22
V23
V24
V25
V26
V27
V28
V29
V30
V31
V32
V33
V34
V35
V36
V37
V38
V39
V40
V41
V42
V43
V44
V45
V46
V47
V48
V49
V50
V51
V52
V53
V54
V55
V56
V57
V58
V59
V60
V61
V62
V63
V64
V65
V66
V67
V68
V69
V70
V71
V72
V73
V74
V75
V76
V77
V78
V79
V80
V81
V82
V83
V84
V85
V86
V87
V88
V89
V90
V91
V92
V93
V94
V95
V96
V97
V98
V99
V100
V101
V102
V103
V104
V105
V106
V107
V108
V109
V110
V111
V112
V113
V114
V115
V116
V117
V118
V119
V120
V121
V122
V123
V124
V125
V126
V127
V128
V129
V130
V131
V132
V133
V134
V135
V136
V137
V138
V139
V140
V141
V142
V143
V144
V145
V146
V147
V148
V149
V150
V151
V152
V153
V154
V155
V156
V157
V158
V159
V160
V161
V162
V163
V164
V165
V166
V167
V168
V169
V170
V171
V172
V173
V174
V175
V176
V177
V178
V179
V180
V181
V182
V183
V184
V185
V186
V187
V188
V189
V190
V191
V192
V193
V194
V195
V196
V197
V198
V199
V200
V201
V202
V203
V204
V205
V206
V207
V208
V209
V210
V211
V212
V213
V214
V215
V216
V217
V218
V219
V220
V221
V222
V223
V224
V225
V226
V227
V228
V229
V230
V231
V232
V233
V234
V235
V236
V237
V238
V239
V240
V241
V242
V243
V244
V245
V246
V247
V248
V249
V250
V251
V252
V253
V254
V255
V256
V257
V258
V259
V260
V261
V262
V263
V264
V265
V266
V267
V268
V269
V270
V271
V272
V273
V274
V275
V276
V277
V278
V279
V280
V281
V282
V283
V284
V285
V286
V287
V288
V289
V290
V291
V292
V293
V294
V295
V296
V297
V298
V299
V300
V301
V302
V303
V304
V305
V306
V307
V308
V309
V310
V311
V312
V313
V314
V315
V316
V317
V318
V319
V320
V321
V322
V323
V324
V325
V326
V327
V328
V329
V330
V331
V332
V333
V334
V335
V336
V337
V338
V339
V340
V341
V342
V343
V344
V345
V346
V347
V348
V349
V350
V351
V352
V353
V354
V355
V356
V357
V358
V359
V360
V361
V362
V363
V364
V365
V366
V367
V368
V369
V370
V371
V372
V373
V374
V375
V376
V377
V378
V379
V380
V381
V382
V383
V384
V385
V386
V387
V388
V389
V390
V391
V392
V393
V394
V395
V396
V397
V398
V399
V400
V401
V402
V403
V404
V405
V406
V407
V408
V409
V410
V411
V412
V413
V414
V415
V416
V417
V418
V419
V420
V421
V422
V423
V424
V425
V426
V427
V428
V429
V430
V431
V432
V433
V434
V435
V436
V437
V438
V439
V440
V441
V442
V443
V444
V445
V446
V447
V448
V449
V450
V451
V452
V453
V454
V455
V456
V457
V458
V459
V460
V461
V462
V463
V464
V465
V466
V467
V468
V469
V470
V471
V472
V473
V474
V475
V476
V477
V478
V479
V480
V481
V482
V483
V484
V485
V486
V487
V488
V489
V490
V491
V492
V493
V494
V495
V496
V497
V498
V499
V500
V501
V502
V503
V504
V505
V506
V507
V508
V509
V510
V511
V512
V513
V514
V515
V516
V517
V518
V519
V520
V521
V522
V523
V524
V525
V526
V527
V528
V529
V530
V531
V532
V533
V534
V535
V536
V537
V538
V539
V540
V541
V542
V543
V544
V545
V546
V547
V548
V549
V550
V551
V552
V553
V554
V555
V556
V557
V558
V559
V560
V561
V562
V563
V564
V565
V566
V567
V568
V569
V570
V571
V572
V573
V574
V575
V576
V577
V578
V579
V580
V581
V582
V583
V584
V585
V586
V587
V588
V589
V590
V591
V592
V593
V594
V595
V596
V597
V598
V599
V600
V601
V602
V603
V604
V605
V606
V607
V608
V609
V610
V611
V612
V613
V614
V615
V616
V617
V618
V619
V620
V621
V622
V623
V624
V625
V626
V627
V628
V629
V630
V631
V632
V633
V634
V635
V636
V637
V638
V639
V640
V641
V642
V643
V644
V645
V646
V647
V648
V649
V650
V651
V652
V653
V654
V655
V656
V657
V658
V659
V660
V661
V662
V663
V664
V665
V666
V667
V668
V669
V670
V671
V672
V673
V674
V675
V676
V677
V678
V679
V680
V681
V682
V683
V684
V685
V686
V687
V688
V689
V690
V691
V692
V693
V694
V695
V696
V697
V698
V699
V700
V701
V702
V703
V704
V705
V706
V707
V708
V709
V710
V711
V712
V713
V714
V715
V716
V717
V718
V719
V720
V721
V722
V723
V724
V725
V726
V727
V728
V729
V730
V731
V732
V733
V734
V735
V736
V737
V738
V739
V740
V741
V742
V743
V744
V745
V746
V747
V748
V749
V750
V751
V752
V753
V754
V755
V756
V757
V758
V759
V760
V761
V762
V763
V764
V765
V766
V767
V768
V769
V770
V771
V772
V773
V774
V775
V776
V777
V778
V779
V780
V781
V782
V783
V784
V785
V786
V787
V788
V789
V790
V791
V792
V793
V794
V795
V796
V797
V798
V799
V800
V801
V802
V803
V804
V805
V806
V807
V808
V809
V810
V811
V812
V813
V814
V815
V816
V817
V818
V819
V820
V821
V822
V823
V824
V825
V826
V827
V828
V829
V830
V831
V832
V833
V834
V835
V836
V837
V838
V839
V840
V841
V842
V843
V844
V845
V846
V847
V848
V849
V850
V851
V852
V853
V854
V855
V856
V857
V858
V859
V860
V861
V862
V863
V864
V865
V866
V867
V868
V869
V870
V871
V872
V873
V874
V875
V876
V877
V878
V879
V880
V881
V882
V883
V884
V885
V886
V887
V888
V889
V890
V891
V892
V893
V894
V895
V896
V897
V898
V899
V900
V901
V902
V903
V904
V905
V906
V907
V908
V909
V910
V911
V912
V913
V914
V915
V916
V917
V918
V919
V920
V921
V922
V923
V924
V925
V926
V927
V928
V929
V930
V931
V932
V933
V934
V935
V936
V937
V938
V939
V940
V941
V942
V943
V944
V945
V946
V947
V948
V949
V950
V951
V952
V953
V954
V955
V956
V957
V958
V959
V960
V961
V962
V963
V964
V965
V966
V967
V968
V969
V970
V971
V972
V973
V974
V975
V976
V977
V978
V979
V980
V981
V982
V983
V984
V985
V986
V987
V988
V989
V990
V991
V992
V993
V994
V995
V996
V997
V998
V999
V1000

【圖4】
ppm
V1
V2
V3
V4
V5
V6
V7
V8
V9
V10
V11
V12
V13
V14
V15
V16
V17
V18
V19
V20
V21
V22
V23
V24
V25
V26
V27
V28
V29
V30
V31
V32
V33
V34
V35
V36
V37
V38
V39
V40
V41
V42
V43
V44
V45
V46
V47
V48
V49
V50
V51
V52
V53
V54
V55
V56
V57
V58
V59
V60
V61
V62
V63
V64
V65
V66
V67
V68
V69
V70
V71
V72
V73
V74
V75
V76
V77
V78
V79
V80
V81
V82
V83
V84
V85
V86
V87
V88
V89
V90
V91
V92
V93
V94
V95
V96
V97
V98
V99
V100
V101
V102
V103
V104
V105
V106
V107
V108
V109
V110
V111
V112
V113
V114
V115
V116
V117
V118
V119
V120
V121
V122
V123
V124
V125
V126
V127
V128
V129
V130
V131
V132
V133
V134
V135
V136
V137
V138
V139
V140
V141
V142
V143
V144
V145
V146
V147
V148
V149
V150
V151
V152
V153
V154
V155
V156
V157
V158
V159
V160
V161
V162
V163
V164
V165
V166
V167
V168
V169
V170
V171
V172
V173
V174
V175
V176
V177
V178
V179
V180
V181
V182
V183
V184
V185
V186
V187
V188
V189
V190
V191
V192
V193
V194
V195
V196
V197
V198
V199
V200
V201
V202
V203
V204
V205
V206
V207
V208
V209
V210
V211
V212
V213
V214
V215
V216
V217
V218
V219
V220
V221
V222
V223
V224
V225
V226
V227
V228
V229
V230
V231
V232
V233
V234
V235
V236
V237
V238
V239
V240
V241
V242
V243
V244
V245
V246
V247
V248
V249
V250
V251
V252
V253
V254
V255
V256
V257
V258
V259
V260
V261
V262
V263
V264
V265
V266
V267
V268
V269
V270
V271
V272
V273
V274
V275
V276
V277
V278
V279
V280
V281
V282
V283
V284
V285
V286
V287
V288
V289
V290
V291
V292
V293
V294
V295
V296
V297
V298
V299
V300
V301
V302
V303
V304
V305
V306
V307
V308
V309
V310
V311
V312
V313
V314
V315
V316
V317
V318
V319
V320
V321
V322
V323
V324
V325
V326
V327
V328
V329
V330
V331
V332
V333
V334
V335
V336
V337
V338
V339
V340
V341
V342
V343
V344
V345
V346
V347
V348
V349
V350
V351
V352
V353
V354
V355
V356
V357
V358
V359
V360
V361
V362
V363
V364
V365
V366
V367
V368
V369
V370
V371
V372
V373
V374
V375
V376
V377
V378
V379
V380
V381
V382
V383
V384
V385
V386
V387
V388
V389
V390
V391
V392
V393
V394
V395
V396
V397
V398
V399
V400
V401
V402
V403
V404
V405
V406
V407
V408
V409
V410
V411
V412
V413
V414
V415
V416
V417
V418
V419
V420
V421
V422
V423
V424
V425
V426
V427
V428
V429
V430
V431
V432
V433
V434
V435
V436
V437
V438
V439
V440
V441
V442
V443
V444
V445
V446
V447
V448
V449
V450
V451
V452
V453
V454
V455
V456
V457
V458
V459
V460
V461
V462
V463
V464
V465
V466
V467
V468
V469
V470
V471
V472
V473
V474
V475
V476
V477
V478
V479
V480
V481
V482
V483
V484
V485
V486
V487
V488
V489
V490
V491
V492
V493
V494
V495
V496
V497
V498
V499
V500
V501
V502
V503
V504
V505
V506
V507
V508
V509
V510
V511
V512
V513
V514
V515
V516
V517
V518
V519
V520
V521
V522
V523
V524
V525
V526
V527
V528
V529
V530
V531
V532
V533
V534
V535
V536
V537
V538
V539
V540
V541
V542
V543
V544
V545
V546
V547
V548
V549
V550
V551
V552
V553
V554
V555
V556
V557
V558
V559
V560
V561
V562
V563
V564
V565
V566
V567
V568
V569
V570
V571
V572
V573
V574
V575
V576
V577
V578
V579
V580
V581
V582
V583
V584
V585
V586
V587
V588
V589
V590
V591
V592
V593
V594
V595
V596
V597
V598
V599
V600
V601
V602
V603
V604
V605
V606
V607
V608
V609
V610
V611
V612
V613
V614
V615
V616
V617
V618
V619
V620
V621
V622
V623
V624
V625
V626
V627
V628
V629
V630
V631
V632
V633
V634
V635
V636
V637
V638
V639
V640
V641
V642
V643
V644
V645
V646
V647
V648
V649
V650
V651
V652
V653
V654
V655
V656
V657
V658
V659
V660
V661
V662
V663
V664
V665
V666
V667
V668
V669
V670
V671
V672
V673
V674
V675
V676
V677
V678
V679
V680
V681
V682
V683
V684
V685
V686
V687
V688
V689
V690
V691
V692
V693
V694
V695
V696
V697
V698
V699
V700
V701
V702
V703
V704
V705
V706
V707
V708
V709
V710
V711
V712
V713
V714
V715
V716
V717
V718
V719
V720
V721
V722
V723
V724
V725
V726
V727
V728
V729
V730
V731
V732
V733
V734
V735
V736
V737
V738
V739
V740
V741
V742
V743
V744
V745
V746
V747
V748
V749
V750
V751
V752
V753
V754
V755
V756
V757
V758
V759
V760
V761
V762
V763
V764
V765
V766
V767
V768
V769
V770
V771
V772
V773
V774
V775
V776
V777
V778
V779
V780
V781
V782
V783
V784
V785
V786
V787
V788
V789
V790
V791
V792
V793
V794
V795
V796
V797
V798
V799
V800
V801
V802
V803
V804
V805
V806
V807
V808
V809
V810
V811
V812
V813
V814
V815
V816
V817
V818
V819
V820
V821
V822
V823
V824
V825
V826
V827
V828
V829
V830
V831
V832
V833
V834
V835
V836
V837
V838
V839
V840
V841
V842
V843
V844
V845
V846
V847
V848
V849
V850
V851
V852
V853
V854
V855
V856
V857
V858
V859
V860
V861
V862
V863
V864
V865
V866
V867
V868
V869
V870
V871
V872
V873
V874
V875
V876
V877
V878
V879
V880
V881
V882
V883
V884
V885
V886
V887
V888
V889
V890
V891
V892
V893
V894
V895
V896
V897
V898
V899
V900
V901
V902
V903
V904
V905
V906
V907
V908
V909
V910
V911
V912
V913
V914
V915
V916
V917
V918
V919
V920
V921
V922
V923
V924
V925
V926
V927
V928
V929
V930
V931
V932
V933
V934
V935
V936
V937
V938
V939
V940
V941
V942
V943
V944
V945
V946
V947
V948
V949
V950
V951
V952
V953
V954
V955
V956
V957
V958
V959
V960
V961
V962
V963
V964
V965
V966
V967
V968
V969
V970
V971
V972
V973
V974
V975
V976
V977
V978
V979
V980
V981
V982
V983
V984
V985
V986
V987
V988
V989
V990
V991
V992
V993
V994
V995
V996
V997
V998
V999
V1000

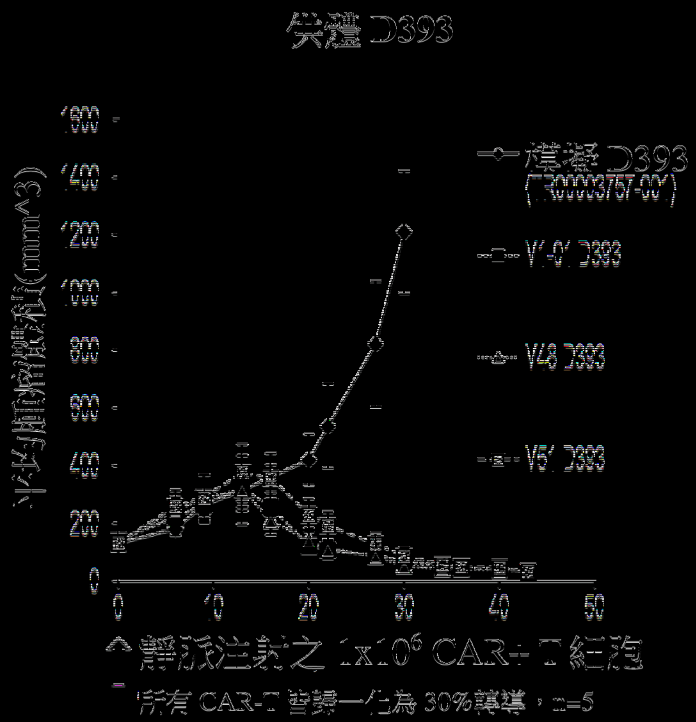
圖7A
圖7B
圖7C
圖7D
ppm
Mw
Mn
Mz
Mz/Mw
Mw/Mn

水分離出容積(cm³/g)
吸水量(g/g)
無CAR
CAR 5%
CAR 10%
CAR 20%
CAR 50%
無CAR
CAR 5%
CAR 10%
CAR 20%
CAR 50%

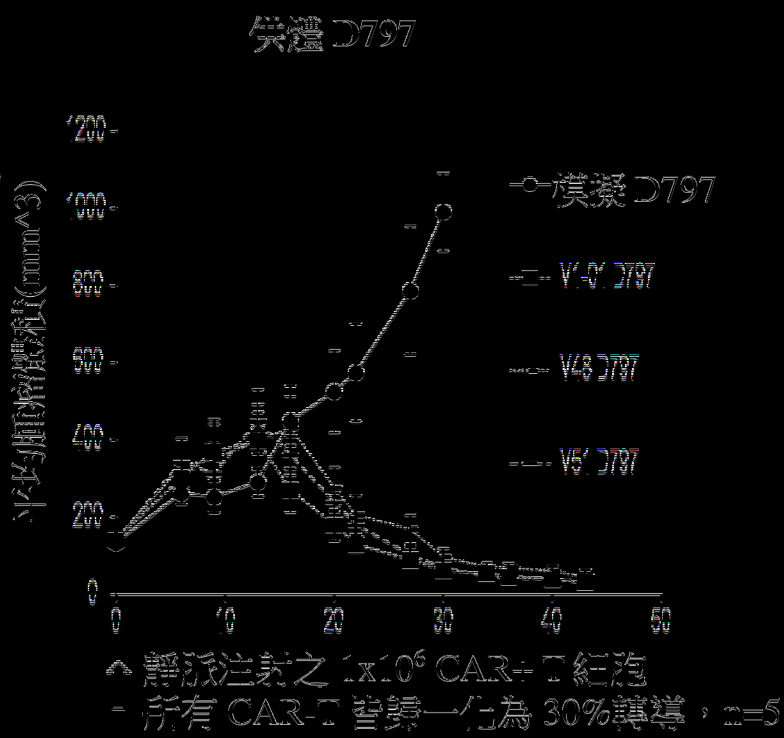
圖8A


供體 D686
小鼠腫瘤體積(mm^3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
CD19-28-1XX D686
V1-01-28-1XX D393-2
V5-28-1XX D686
V48-28-1XX D686
V51-28-1XX D686
↑靜脈注射之 1x10^6 CAR+ T 細胞
- 所有 CAR-T 皆歸一化為 50%轉導，n=5

【圖 83】


供體 D393
平均腫瘤體積(mm^3)
模擬 D393
(TR00003757-001)
V101 D393
V48 D393
V51 D393
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
10
20
30
40
50
靜脈注射之 1x10^6 CAR+ T 細胞
所有 CAR-T 皆歸一化為 30%轉導，n=5

【圖 9A】


供體 D797
平均腫瘤體積(mm^3)
模擬 D797
V101 D797
V48 D797
V51 D797
0
200
400
600
800
1000
1200
10
20
30
40
50
靜脈注射之 1x10^6 CAR+ T 細胞
所有 CAR-T 皆歸一化為 30%轉導，n=5

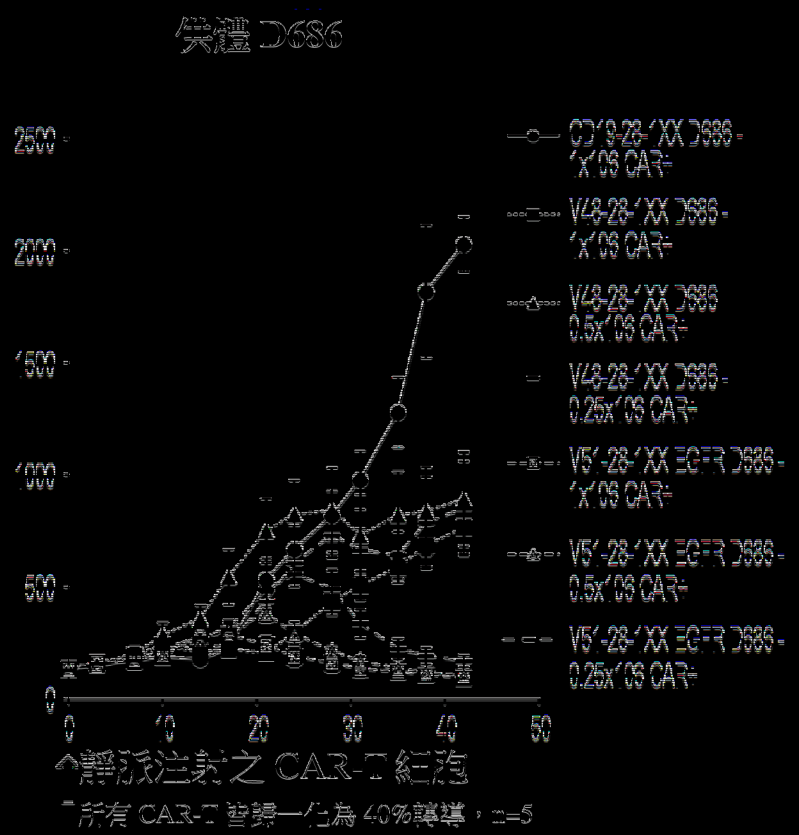
【圖 9B】

水存儲時間(mm^3)
記憶效應之 x10^6 CAR+ 細胞
沒有 CAR+ 細胞—1 天 30%濃度，n=5
(直 9C)
沒有 CAR+ 細胞—1 天
沒有 CAR+ 細胞—7 天

第12I，共2I1(發明圖式)

未分離細胞数(cells/cm²)
細胞分化マーカーCAR-T発現
非分化 CAR-T 細胞 ～5
分化 CAR-T 細胞 30%未満
図1(c)

圖式 3393
圖 1A
圖 1B


供體 D686
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
^靜脈注射之 CAR-T 細胞
*所有 CAR-T 皆歸一化為 40%轉導，n=5
CD19-28-1XX D686 - 1x10^6 CAR+
V48-28-1XX D686 - 1x10^6 CAR+
V48-28-1XX D686 0.5x10^6 CAR+
V48-28-1XX D686 - 0.25x10^6 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 1x10^6 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 0.5x10^6 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 0.25x10^6 CAR+

【圖 11C】

CD4+CD8+
VEGFR2+CAR+
VEGFR2+CAR-
VEGFR2-CAR+
VEGFR2-CAR-
細胞數目
CAR-T 細胞擴增倍數
第 1 天
第 7 天
第 14 天
第 21 天
第 28 天
第 35 天
第 42 天
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
CAR-T 細胞擴增倍數
第 7 天
第 14 天
第 21 天
第 28 天
第 35 天
第 42 天
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

第 16 圖

CD4+CD8+
VEGFR2+CAR+
VEGFR2+CAR-
VEGFR2-CAR+
VEGFR2-CAR-
細胞數目
CAR-T 細胞擴增倍數
第 1 天
第 7 天
第 14 天
第 21 天
第 28 天
第 35 天
第 42 天
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
CAR-T 細胞擴增倍數
第 7 天
第 14 天
第 21 天
第 28 天
第 35 天
第 42 天
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

第 17 圖

圖 2C7
無 CAR 基因修飾 T 細胞
CAR 基因修飾 T 細胞
腫瘤體積 (mm³)
天數
CAR-
VH-
VL-
CD8-
CD28-
4-1BB-
CD3ζ-

小干扰时滞稳定区(mm/s)
无CAR-T细胞—治疗30%感染细胞，s=5
CAR-T细胞治疗后感染细胞数量N，×10⁶
CAR-T细胞治疗后病毒载量V，×10⁶ copies/mL

【图3B】

小干扰时滞稳定区(mm/s)
无CAR-T细胞治疗30%感染细胞，s=5
CAR-T细胞治疗后感染细胞数量N，×10⁶
CAR-T细胞治疗后病毒载量V，×10⁶ copies/mL

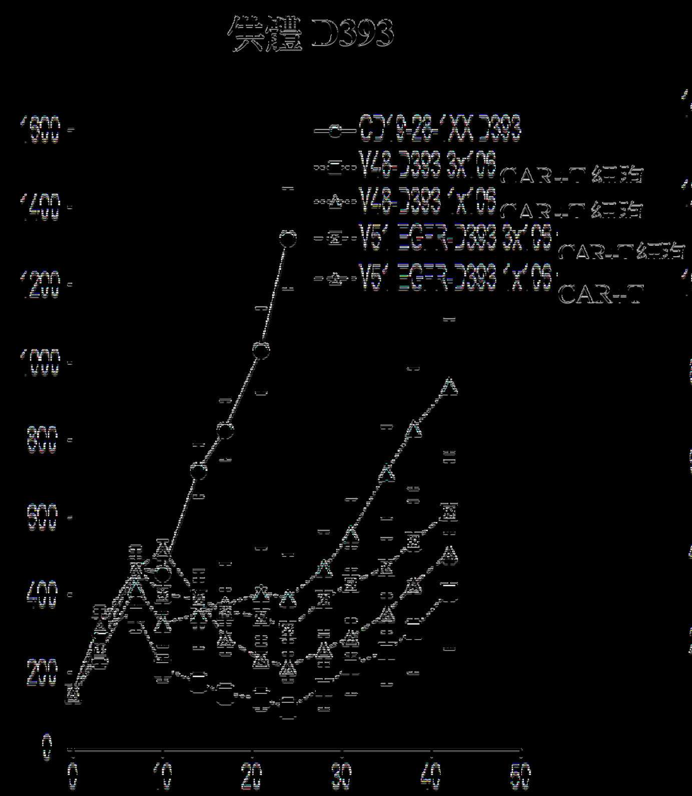
【图3A】

水平加速度振幅(cm/s²)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
時間(秒)
無CAR+
有CAR+
無CAR-
有CAR-

【圖4A】

水平加速度振幅(cm/s²)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
時間(秒)
無CAR+
有CAR+
無CAR-
有CAR-

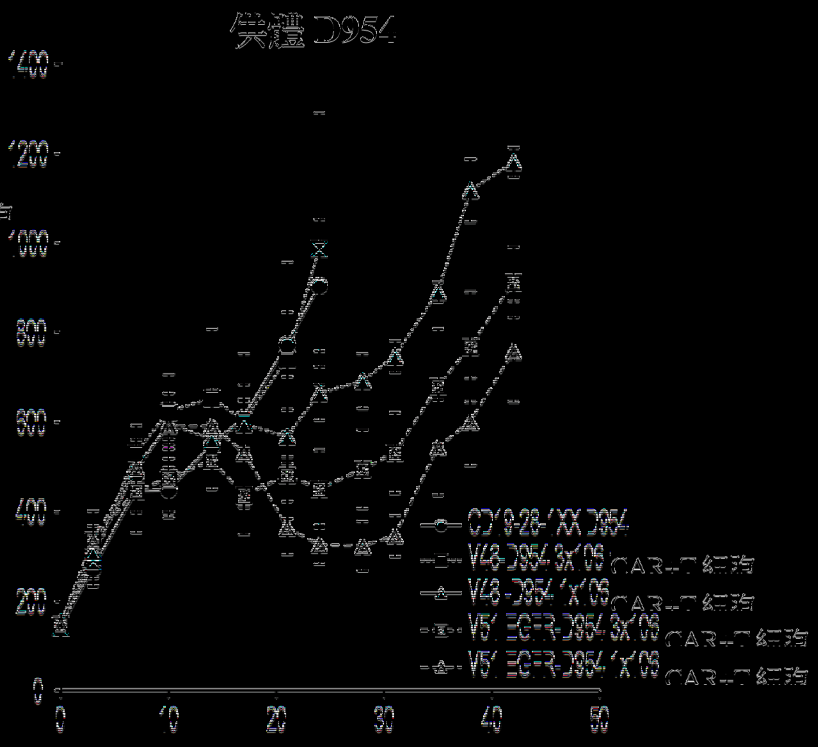
【圖4B】



↑靜脈注射之 CAR-T 細胞

所有 CAR-T 皆歸一化為 50%轉導，n=5

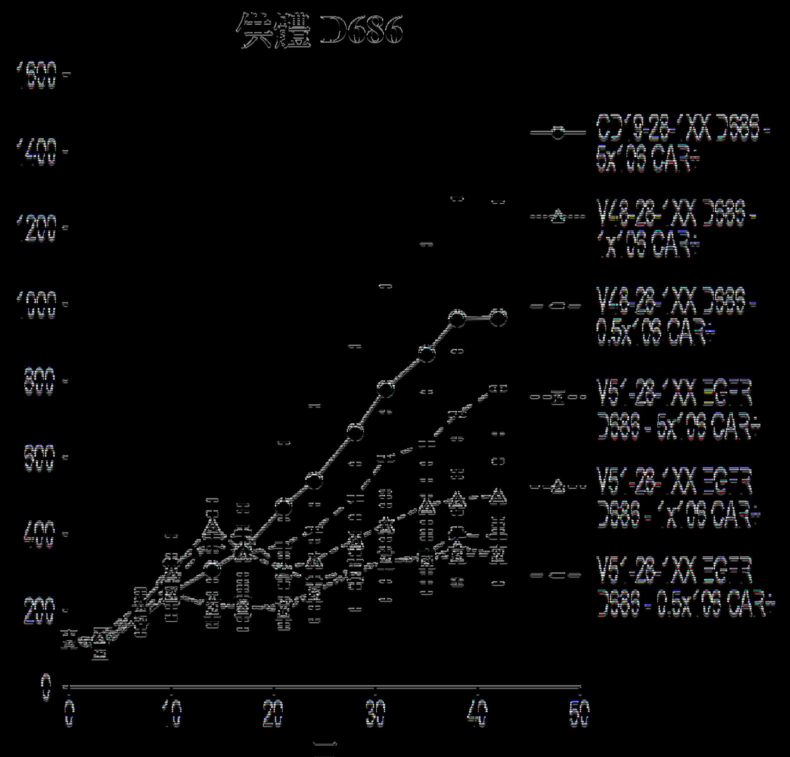
【圖 15A】



↑靜脈注射之 CAR-T 細胞

所有 CAR-T 皆歸一化為 50%轉導，n=5

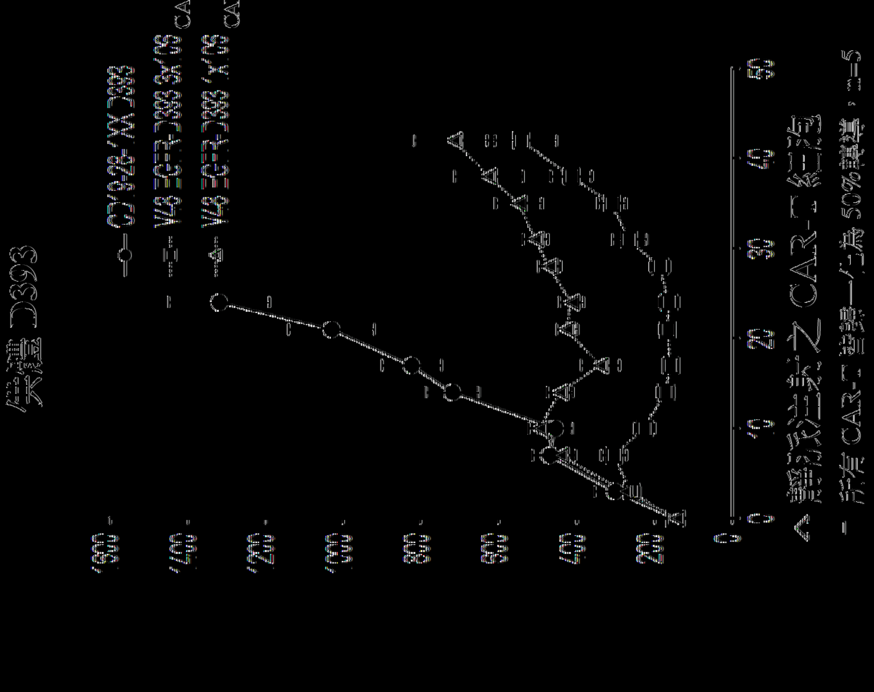
【圖 15B】



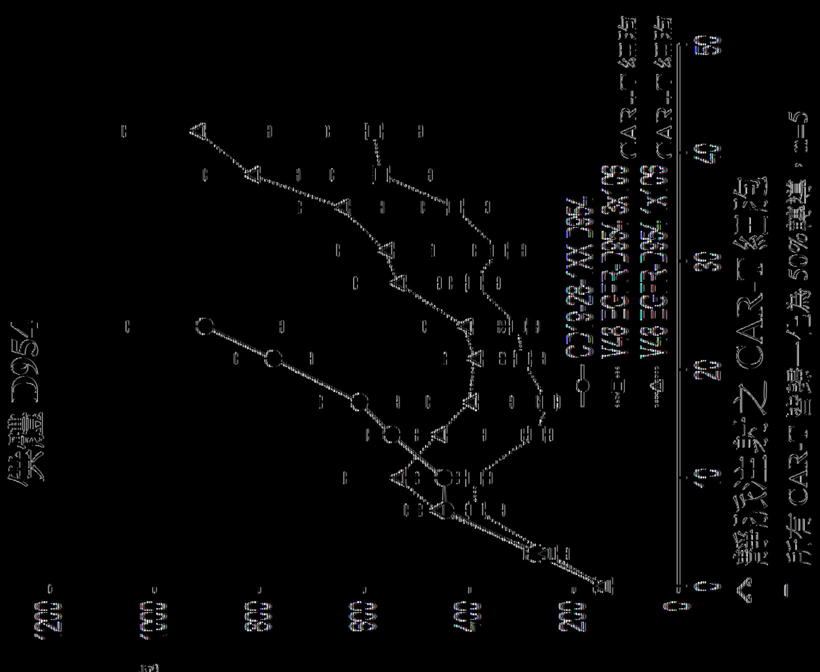
^ 靜脈注射之 CAR-T 細胞

¯ 所有 CAR-T 皆歸一化為 40%轉導，n=5

【圖 15C】

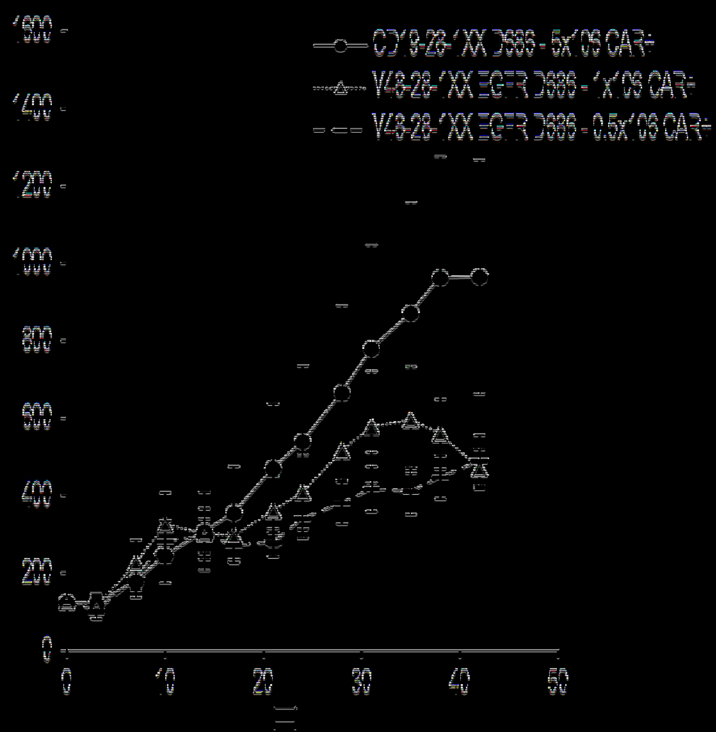

1800
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
所有 CAR-T 劑量一律為 50%轉導，n=5

【圖16A】


1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
所有 CAR-T 劑量一律為 50%轉導，n=5

【圖16B】

供體 D686



↑ 靜脈注射之 CAR-T 細胞

* 所有 CAR-T 皆歸一化為 40%轉導，n=5

【圖 16C】

水平距離(mm×3)
垂直距離(mm×3)
CAR-1
CAR-2
CAR-3
CAR-4
CAR-5
CAR-6
CAR-7
CAR-8
CAR-9
CAR-10
CAR-11
CAR-12
CAR-13
CAR-14
CAR-15
CAR-16
CAR-17
CAR-18
CAR-19
CAR-20
CAR-21
CAR-22
CAR-23
CAR-24
CAR-25
CAR-26
CAR-27
CAR-28
CAR-29
CAR-30
CAR-31
CAR-32
CAR-33
CAR-34
CAR-35
CAR-36
CAR-37
CAR-38
CAR-39
CAR-40
CAR-41
CAR-42
CAR-43
CAR-44
CAR-45
CAR-46
CAR-47
CAR-48
CAR-49
CAR-50
CAR-51
CAR-52
CAR-53
CAR-54
CAR-55
CAR-56
CAR-57
CAR-58
CAR-59
CAR-60
CAR-61
CAR-62
CAR-63
CAR-64
CAR-65
CAR-66
CAR-67
CAR-68
CAR-69
CAR-70
CAR-71
CAR-72
CAR-73
CAR-74
CAR-75
CAR-76
CAR-77
CAR-78
CAR-79
CAR-80
CAR-81
CAR-82
CAR-83
CAR-84
CAR-85
CAR-86
CAR-87
CAR-88
CAR-89
CAR-90
CAR-91
CAR-92
CAR-93
CAR-94
CAR-95
CAR-96
CAR-97
CAR-98
CAR-99
CAR-100
CAR-101
CAR-102
CAR-103
CAR-104
CAR-105
CAR-106
CAR-107
CAR-108
CAR-109
CAR-110
CAR-111
CAR-112
CAR-113
CAR-114
CAR-115
CAR-116
CAR-117
CAR-118
CAR-119
CAR-120
CAR-121
CAR-122
CAR-123
CAR-124
CAR-125
CAR-126
CAR-127
CAR-128
CAR-129
CAR-130
CAR-131
CAR-132
CAR-133
CAR-134
CAR-135
CAR-136
CAR-137
CAR-138
CAR-139
CAR-140
CAR-141
CAR-142
CAR-143
CAR-144
CAR-145
CAR-146
CAR-147
CAR-148
CAR-149
CAR-150
CAR-151
CAR-152
CAR-153
CAR-154
CAR-155
CAR-156
CAR-157
CAR-158
CAR-159
CAR-160
CAR-161
CAR-162
CAR-163
CAR-164
CAR-165
CAR-166
CAR-167
CAR-168
CAR-169
CAR-170
CAR-171
CAR-172
CAR-173
CAR-174
CAR-175
CAR-176
CAR-177
CAR-178
CAR-179
CAR-180
CAR-181
CAR-182
CAR-183
CAR-184
CAR-185
CAR-186
CAR-187
CAR-188
CAR-189
CAR-190
CAR-191
CAR-192
CAR-193
CAR-194
CAR-195
CAR-196
CAR-197
CAR-198
CAR-199
CAR-200
CAR-201
CAR-202
CAR-203
CAR-204
CAR-205
CAR-206
CAR-207
CAR-208
CAR-209
CAR-210
CAR-211
CAR-212
CAR-213
CAR-214
CAR-215
CAR-216
CAR-217
CAR-218
CAR-219
CAR-220
CAR-221
CAR-222
CAR-223
CAR-224
CAR-225
CAR-226
CAR-227
CAR-228
CAR-229
CAR-230
CAR-231
CAR-232
CAR-233
CAR-234
CAR-235
CAR-236
CAR-237
CAR-238
CAR-239
CAR-240
CAR-241
CAR-242
CAR-243
CAR-244
CAR-245
CAR-246
CAR-247
CAR-248
CAR-249
CAR-250
CAR-251
CAR-252
CAR-253
CAR-254
CAR-255
CAR-256
CAR-257
CAR-258
CAR-259
CAR-260
CAR-261
CAR-262
CAR-263
CAR-264
CAR-265
CAR-266
CAR-267
CAR-268
CAR-269
CAR-270
CAR-271
CAR-272
CAR-273
CAR-274
CAR-275
CAR-276
CAR-277
CAR-278
CAR-279
CAR-280
CAR-281
CAR-282
CAR-283
CAR-284
CAR-285
CAR-286
CAR-287
CAR-288
CAR-289
CAR-290
CAR-291
CAR-292
CAR-293
CAR-294
CAR-295
CAR-296
CAR-297
CAR-298
CAR-299
CAR-300
CAR-301
CAR-302
CAR-303
CAR-304
CAR-305
CAR-306
CAR-307
CAR-308
CAR-309
CAR-310
CAR-311
CAR-312
CAR-313
CAR-314
CAR-315
CAR-316
CAR-317
CAR-318
CAR-319
CAR-320
CAR-321
CAR-322
CAR-323
CAR-324
CAR-325
CAR-326
CAR-327
CAR-328
CAR-329
CAR-330
CAR-331
CAR-332
CAR-333
CAR-334
CAR-335
CAR-336
CAR-337
CAR-338
CAR-339
CAR-340
CAR-341
CAR-342
CAR-343
CAR-344
CAR-345
CAR-346
CAR-347
CAR-348
CAR-349
CAR-350
CAR-351
CAR-352
CAR-353
CAR-354
CAR-355
CAR-356
CAR-357
CAR-358
CAR-359
CAR-360
CAR-361
CAR-362
CAR-363
CAR-364
CAR-365
CAR-366
CAR-367
CAR-368
CAR-369
CAR-370
CAR-371
CAR-372
CAR-373
CAR-374
CAR-375
CAR-376
CAR-377
CAR-378
CAR-379
CAR-380
CAR-381
CAR-382
CAR-383
CAR-384
CAR-385
CAR-386
CAR-387
CAR-388
CAR-389
CAR-390
CAR-391
CAR-392
CAR-393
CAR-394
CAR-395
CAR-396
CAR-397
CAR-398
CAR-399
CAR-400
CAR-401
CAR-402
CAR-403
CAR-404
CAR-405
CAR-406
CAR-407
CAR-408
CAR-409
CAR-410
CAR-411
CAR-412
CAR-413
CAR-414
CAR-415
CAR-416
CAR-417
CAR-418
CAR-419
CAR-420
CAR-421
CAR-422
CAR-423
CAR-424
CAR-425
CAR-426
CAR-427
CAR-428
CAR-429
CAR-430
CAR-431
CAR-432
CAR-433
CAR-434
CAR-435
CAR-436
CAR-437
CAR-438
CAR-439
CAR-440
CAR-441
CAR-442
CAR-443
CAR-444
CAR-445
CAR-446
CAR-447
CAR-448
CAR-449
CAR-450
CAR-451
CAR-452
CAR-453
CAR-454
CAR-455
CAR-456
CAR-457
CAR-458
CAR-459
CAR-460
CAR-461
CAR-462
CAR-463
CAR-464
CAR-465
CAR-466
CAR-467
CAR-468
CAR-469
CAR-470
CAR-471
CAR-472
CAR-473
CAR-474
CAR-475
CAR-476
CAR-477
CAR-478
CAR-479
CAR-480
CAR-481
CAR-482
CAR-483
CAR-484
CAR-485
CAR-486
CAR-487
CAR-488
CAR-489
CAR-490
CAR-491
CAR-492
CAR-493
CAR-494
CAR-495
CAR-496
CAR-497
CAR-498
CAR-499
CAR-500
CAR-501
CAR-502
CAR-503
CAR-504
CAR-505
CAR-506
CAR-507
CAR-508
CAR-509
CAR-510
CAR-511
CAR-512
CAR-513
CAR-514
CAR-515
CAR-516
CAR-517
CAR-518
CAR-519
CAR-520
CAR-521
CAR-522
CAR-523
CAR-524
CAR-525
CAR-526
CAR-527
CAR-528
CAR-529
CAR-530
CAR-531
CAR-532
CAR-533
CAR-534
CAR-535
CAR-536
CAR-537
CAR-538
CAR-539
CAR-540
CAR-541
CAR-542
CAR-543
CAR-544
CAR-545
CAR-546
CAR-547
CAR-548
CAR-549
CAR-550
CAR-551
CAR-552
CAR-553
CAR-554
CAR-555
CAR-556
CAR-557
CAR-558
CAR-559
CAR-560
CAR-561
CAR-562
CAR-563
CAR-564
CAR-565
CAR-566
CAR-567
CAR-568
CAR-569
CAR-570
CAR-571
CAR-572
CAR-573
CAR-574
CAR-575
CAR-576
CAR-577
CAR-578
CAR-579
CAR-580
CAR-581
CAR-582
CAR-583
CAR-584
CAR-585
CAR-586
CAR-587
CAR-588
CAR-589
CAR-590
CAR-591
CAR-592
CAR-593
CAR-594
CAR-595
CAR-596
CAR-597
CAR-598
CAR-599
CAR-600
CAR-601
CAR-602
CAR-603
CAR-604
CAR-605
CAR-606
CAR-607
CAR-608
CAR-609
CAR-610
CAR-611
CAR-612
CAR-613
CAR-614
CAR-615
CAR-616
CAR-617
CAR-618
CAR-619
CAR-620
CAR-621
CAR-622
CAR-623
CAR-624
CAR-625
CAR-626
CAR-627
CAR-628
CAR-629
CAR-630
CAR-631
CAR-632
CAR-633
CAR-634
CAR-635
CAR-636
CAR-637
CAR-638
CAR-639
CAR-640
CAR-641
CAR-642
CAR-643
CAR-644
CAR-645
CAR-646
CAR-647
CAR-648
CAR-649
CAR-650
CAR-651
CAR-652
CAR-653
CAR-654
CAR-655
CAR-656
CAR-657
CAR-658
CAR-659
CAR-660
CAR-661
CAR-662
CAR-663
CAR-664
CAR-665
CAR-666
CAR-667
CAR-668
CAR-669
CAR-670
CAR-671
CAR-672
CAR-673
CAR-674
CAR-675
CAR-676
CAR-677
CAR-678
CAR-679
CAR-680
CAR-681
CAR-682
CAR-683
CAR-684
CAR-685
CAR-686
CAR-687
CAR-688
CAR-689
CAR-690
CAR-691
CAR-692
CAR-693
CAR-694
CAR-695
CAR-696
CAR-697
CAR-698
CAR-699
CAR-700
CAR-701
CAR-702
CAR-703
CAR-704
CAR-705
CAR-706
CAR-707
CAR-708
CAR-709
CAR-710
CAR-711
CAR-712
CAR-713
CAR-714
CAR-715
CAR-716
CAR-717
CAR-718
CAR-719
CAR-720
CAR-721
CAR-722
CAR-723
CAR-724
CAR-725
CAR-726
CAR-727
CAR-728
CAR-729
CAR-730
CAR-731
CAR-732
CAR-733
CAR-734
CAR-735
CAR-736
CAR-737
CAR-738
CAR-739
CAR-740
CAR-741
CAR-742
CAR-743
CAR-744
CAR-745
CAR-746
CAR-747
CAR-748
CAR-749
CAR-750
CAR-751
CAR-752
CAR-753
CAR-754
CAR-755
CAR-756
CAR-757
CAR-758
CAR-759
CAR-760
CAR-761
CAR-762
CAR-763
CAR-764
CAR-765
CAR-766
CAR-767
CAR-768
CAR-769
CAR-770
CAR-771
CAR-772
CAR-773
CAR-774
CAR-775
CAR-776
CAR-777
CAR-778
CAR-779
CAR-780
CAR-781
CAR-782
CAR-783
CAR-784
CAR-785
CAR-786
CAR-787
CAR-788
CAR-789
CAR-790
CAR-791
CAR-792
CAR-793
CAR-794
CAR-795
CAR-796
CAR-797
CAR-798
CAR-799
CAR-800
CAR-801
CAR-802
CAR-803
CAR-804
CAR-805
CAR-806
CAR-807
CAR-808
CAR-809
CAR-810
CAR-811
CAR-812
CAR-813
CAR-814
CAR-815
CAR-816
CAR-817
CAR-818
CAR-819
CAR-820
CAR-821
CAR-822
CAR-823
CAR-824
CAR-825
CAR-826
CAR-827
CAR-828
CAR-829
CAR-830
CAR-831
CAR-832
CAR-833
CAR-834
CAR-835
CAR-836
CAR-837
CAR-838
CAR-839
CAR-840
CAR-841
CAR-842
CAR-843
CAR-844
CAR-845
CAR-846
CAR-847
CAR-848
CAR-849
CAR-850
CAR-851
CAR-852
CAR-853
CAR-854
CAR-855
CAR-856
CAR-857
CAR-858
CAR-859
CAR-860
CAR-861
CAR-862
CAR-863
CAR-864
CAR-865
CAR-866
CAR-867
CAR-868
CAR-869
CAR-870
CAR-871
CAR-872
CAR-873
CAR-874
CAR-875
CAR-876
CAR-877
CAR-878
CAR-879
CAR-880
CAR-881
CAR-882
CAR-883
CAR-884
CAR-885
CAR-886
CAR-887
CAR-888
CAR-889
CAR-890
CAR-891
CAR-892
CAR-893
CAR-894
CAR-895
CAR-896
CAR-897
CAR-898
CAR-899
CAR-900
CAR-901
CAR-902
CAR-903
CAR-904
CAR-905
CAR-906
CAR-907
CAR-908
CAR-909
CAR-910
CAR-911
CAR-912
CAR-913
CAR-914
CAR-915
CAR-916
CAR-917
CAR-918
CAR-919
CAR-920
CAR-921
CAR-922
CAR-923
CAR-924
CAR-925
CAR-926
CAR-927
CAR-928
CAR-929
CAR-930
CAR-931
CAR-932
CAR-933
CAR-934
CAR-935
CAR-936
CAR-937
CAR-938
CAR-939
CAR-940
CAR-941
CAR-942
CAR-943
CAR-944
CAR-945
CAR-946
CAR-947
CAR-948
CAR-949
CAR-950
CAR-951
CAR-952
CAR-953
CAR-954
CAR-955
CAR-956
CAR-957
CAR-958
CAR-959
CAR-960
CAR-961
CAR-962
CAR-963
CAR-964
CAR-965
CAR-966
CAR-967
CAR-968
CAR-969
CAR-970
CAR-971
CAR-972
CAR-973
CAR-974
CAR-975
CAR-976
CAR-977
CAR-978
CAR-979
CAR-980
CAR-981
CAR-982
CAR-983
CAR-984
CAR-985
CAR-986
CAR-987
CAR-988
CAR-989
CAR-990
CAR-991
CAR-992
CAR-993
CAR-994
CAR-995
CAR-996
CAR-997
CAR-998
CAR-999
CAR-1000

【圖 7】

水平距離(mm×3)
垂直距離(mm×3)
CAR-1
CAR-2
CAR-3
CAR-4
CAR-5
CAR-6
CAR-7
CAR-8
CAR-9
CAR-10
CAR-11
CAR-12
CAR-13
CAR-14
CAR-15
CAR-16
CAR-17
CAR-18
CAR-19
CAR-20
CAR-21
CAR-22
CAR-23
CAR-24
CAR-25
CAR-26
CAR-27
CAR-28
CAR-29
CAR-30
CAR-31
CAR-32
CAR-33
CAR-34
CAR-35
CAR-36
CAR-37
CAR-38
CAR-39
CAR-40
CAR-41
CAR-42
CAR-43
CAR-44
CAR-45
CAR-46
CAR-47
CAR-48
CAR-49
CAR-50
CAR-51
CAR-52
CAR-53
CAR-54
CAR-55
CAR-56
CAR-57
CAR-58
CAR-59
CAR-60
CAR-61
CAR-62
CAR-63
CAR-64
CAR-65
CAR-66
CAR-67
CAR-68
CAR-69
CAR-70
CAR-71
CAR-72
CAR-73
CAR-74
CAR-75
CAR-76
CAR-77
CAR-78
CAR-79
CAR-80
CAR-81
CAR-82
CAR-83
CAR-84
CAR-85
CAR-86
CAR-87
CAR-88
CAR-89
CAR-90
CAR-91
CAR-92
CAR-93
CAR-94
CAR-95
CAR-96
CAR-97
CAR-98
CAR-99
CAR-100
CAR-101
CAR-102
CAR-103
CAR-104
CAR-105
CAR-106
CAR-107
CAR-108
CAR-109
CAR-110
CAR-111
CAR-112
CAR-113
CAR-114
CAR-115
CAR-116
CAR-117
CAR-118
CAR-119
CAR-120
CAR-121
CAR-122
CAR-123
CAR-124
CAR-125
CAR-126
CAR-127
CAR-128
CAR-129
CAR-130
CAR-131
CAR-132
CAR-133
CAR-134
CAR-135
CAR-136
CAR-137
CAR-138
CAR-139
CAR-140
CAR-141
CAR-142
CAR-143
CAR-144
CAR-145
CAR-146
CAR-147
CAR-148
CAR-149
CAR-150
CAR-151
CAR-152
CAR-153
CAR-154
CAR-155
CAR-156
CAR-157
CAR-158
CAR-159
CAR-160
CAR-161
CAR-162
CAR-163
CAR-164
CAR-165
CAR-166
CAR-167
CAR-168
CAR-169
CAR-170
CAR-171
CAR-172
CAR-173
CAR-174
CAR-175
CAR-176
CAR-177
CAR-178
CAR-179
CAR-180
CAR-181
CAR-182
CAR-183
CAR-184
CAR-185
CAR-186
CAR-187
CAR-188
CAR-189
CAR-190
CAR-191
CAR-192
CAR-193
CAR-194
CAR-195
CAR-196
CAR-197
CAR-198
CAR-199
CAR-200
CAR-201
CAR-202
CAR-203
CAR-204
CAR-205
CAR-206
CAR-207
CAR-208
CAR-209
CAR-210
CAR-211
CAR-212
CAR-213
CAR-214
CAR-215
CAR-216
CAR-217
CAR-218
CAR-219
CAR-220
CAR-221
CAR-222
CAR-223
CAR-224
CAR-225
CAR-226
CAR-227
CAR-228
CAR-229
CAR-230
CAR-231
CAR-232
CAR-233
CAR-234
CAR-235
CAR-236
CAR-237
CAR-238
CAR-239
CAR-240
CAR-241
CAR-242
CAR-243
CAR-244
CAR-245
CAR-246
CAR-247
CAR-248
CAR-249
CAR-250
CAR-251
CAR-252
CAR-253
CAR-254
CAR-255
CAR-256
CAR-257
CAR-258
CAR-259
CAR-260
CAR-261
CAR-262
CAR-263
CAR-264
CAR-265
CAR-266
CAR-267
CAR-268
CAR-269
CAR-270
CAR-271
CAR-272
CAR-273
CAR-274
CAR-275
CAR-276
CAR-277
CAR-278
CAR-279
CAR-280
CAR-281
CAR-282
CAR-283
CAR-284
CAR-285
CAR-286
CAR-287
CAR-288
CAR-289
CAR-290
CAR-291
CAR-292
CAR-293
CAR-294
CAR-295
CAR-296
CAR-297
CAR-298
CAR-299
CAR-300
CAR-301
CAR-302
CAR-303
CAR-304
CAR-305
CAR-306
CAR-307
CAR-308
CAR-309
CAR-310
CAR-311
CAR-312
CAR-313
CAR-314
CAR-315
CAR-316
CAR-317
CAR-318
CAR-319
CAR-320
CAR-321
CAR-322
CAR-323
CAR-324
CAR-325
CAR-326
CAR-327
CAR-328
CAR-329
CAR-330
CAR-331
CAR-332
CAR-333
CAR-334
CAR-335
CAR-336
CAR-337
CAR-338
CAR-339
CAR-340
CAR-341
CAR-342
CAR-343
CAR-344
CAR-345
CAR-346
CAR-347
CAR-348
CAR-349
CAR-350
CAR-351
CAR-352
CAR-353
CAR-354
CAR-355
CAR-356
CAR-357
CAR-358
CAR-359
CAR-360
CAR-361
CAR-362
CAR-363
CAR-364
CAR-365
CAR-366
CAR-367
CAR-368
CAR-369
CAR-370
CAR-371
CAR-372
CAR-373
CAR-374
CAR-375
CAR-376
CAR-377
CAR-378
CAR-379
CAR-380
CAR-381
CAR-382
CAR-383
CAR-384
CAR-385
CAR-386
CAR-387
CAR-388
CAR-389
CAR-390
CAR-391
CAR-392
CAR-393
CAR-394
CAR-395
CAR-396
CAR-397
CAR-398
CAR-399
CAR-400
CAR-401
CAR-402
CAR-403
CAR-404
CAR-405
CAR-406
CAR-407
CAR-408
CAR-409
CAR-410
CAR-411
CAR-412
CAR-413
CAR-414
CAR-415
CAR-416
CAR-417
CAR-418
CAR-419
CAR-420
CAR-421
CAR-422
CAR-423
CAR-424
CAR-425
CAR-426
CAR-427
CAR-428
CAR-429
CAR-430
CAR-431
CAR-432
CAR-433
CAR-434
CAR-435
CAR-436
CAR-437
CAR-438
CAR-439
CAR-440
CAR-441
CAR-442
CAR-443
CAR-444
CAR-445
CAR-446
CAR-447
CAR-448
CAR-449
CAR-450
CAR-451
CAR-452
CAR-453
CAR-454
CAR-455
CAR-456
CAR-457
CAR-458
CAR-459
CAR-460
CAR-461
CAR-462
CAR-463
CAR-464
CAR-465
CAR-466
CAR-467
CAR-468
CAR-469
CAR-470
CAR-471
CAR-472
CAR-473
CAR-474
CAR-475
CAR-476
CAR-477
CAR-478
CAR-479
CAR-480
CAR-481
CAR-482
CAR-483
CAR-484
CAR-485
CAR-486
CAR-487
CAR-488
CAR-489
CAR-490
CAR-491
CAR-492
CAR-493
CAR-494
CAR-495
CAR-496
CAR-497
CAR-498
CAR-499
CAR-500
CAR-501
CAR-502
CAR-503
CAR-504
CAR-505
CAR-506
CAR-507
CAR-508
CAR-509
CAR-510
CAR-511
CAR-512
CAR-513
CAR-514
CAR-515
CAR-516
CAR-517
CAR-518
CAR-519
CAR-520
CAR-521
CAR-522
CAR-523
CAR-524
CAR-525
CAR-526
CAR-527
CAR-528
CAR-529
CAR-530
CAR-531
CAR-532
CAR-533
CAR-534
CAR-535
CAR-536
CAR-537
CAR-538
CAR-539
CAR-540
CAR-541
CAR-542
CAR-543
CAR-544
CAR-545
CAR-546
CAR-547
CAR-548
CAR-549
CAR-550
CAR-551
CAR-552
CAR-553
CAR-554
CAR-555
CAR-556
CAR-557
CAR-558
CAR-559
CAR-560
CAR-561
CAR-562
CAR-563
CAR-564
CAR-565
CAR-566
CAR-567
CAR-568
CAR-569
CAR-570
CAR-571
CAR-572
CAR-573
CAR-574
CAR-575
CAR-576
CAR-577
CAR-578
CAR-579
CAR-580
CAR-581
CAR-582
CAR-583
CAR-584
CAR-585
CAR-586
CAR-587
CAR-588
CAR-589
CAR-590
CAR-591
CAR-592
CAR-593
CAR-594
CAR-595
CAR-596
CAR-597
CAR-598
CAR-599
CAR-600
CAR-601
CAR-602
CAR-603
CAR-604
CAR-605
CAR-606
CAR-607
CAR-608
CAR-609
CAR-610
CAR-611
CAR-612
CAR-613
CAR-614
CAR-615
CAR-616
CAR-617
CAR-618
CAR-619
CAR-620
CAR-621
CAR-622
CAR-623
CAR-624
CAR-625
CAR-626
CAR-627
CAR-628
CAR-629
CAR-630
CAR-631
CAR-632
CAR-633
CAR-634
CAR-635
CAR-636
CAR-637
CAR-638
CAR-639
CAR-640
CAR-641
CAR-642
CAR-643
CAR-644
CAR-645
CAR-646
CAR-647
CAR-648
CAR-649
CAR-650
CAR-651
CAR-652
CAR-653
CAR-654
CAR-655
CAR-656
CAR-657
CAR-658
CAR-659
CAR-660
CAR-661
CAR-662
CAR-663
CAR-664
CAR-665
CAR-666
CAR-667
CAR-668
CAR-669
CAR-670
CAR-671
CAR-672
CAR-673
CAR-674
CAR-675
CAR-676
CAR-677
CAR-678
CAR-679
CAR-680
CAR-681
CAR-682
CAR-683
CAR-684
CAR-685
CAR-686
CAR-687
CAR-688
CAR-689
CAR-690
CAR-691
CAR-692
CAR-693
CAR-694
CAR-695
CAR-696
CAR-697
CAR-698
CAR-699
CAR-700
CAR-701
CAR-702
CAR-703
CAR-704
CAR-705
CAR-706
CAR-707
CAR-708
CAR-709
CAR-710
CAR-711
CAR-712
CAR-713
CAR-714
CAR-715
CAR-716
CAR-717
CAR-718
CAR-719
CAR-720
CAR-721
CAR-722
CAR-723
CAR-724
CAR-725
CAR-726
CAR-727
CAR-728
CAR-729
CAR-730
CAR-731
CAR-732
CAR-733
CAR-734
CAR-735
CAR-736
CAR-737
CAR-738
CAR-739
CAR-740
CAR-741
CAR-742
CAR-743
CAR-744
CAR-745
CAR-746
CAR-747
CAR-748
CAR-749
CAR-750
CAR-751
CAR-752
CAR-753
CAR-754
CAR-755
CAR-756
CAR-757
CAR-758
CAR-759
CAR-760
CAR-761
CAR-762
CAR-763
CAR-764
CAR-765
CAR-766
CAR-767
CAR-768
CAR-769
CAR-770
CAR-771
CAR-772
CAR-773
CAR-774
CAR-775
CAR-776
CAR-777
CAR-778
CAR-779
CAR-780
CAR-781
CAR-782
CAR-783
CAR-784
CAR-785
CAR-786
CAR-787
CAR-788
CAR-789
CAR-790
CAR-791
CAR-792
CAR-793
CAR-794
CAR-795
CAR-796
CAR-797
CAR-798
CAR-799
CAR-800
CAR-801
CAR-802
CAR-803
CAR-804
CAR-805
CAR-806
CAR-807
CAR-808
CAR-809
CAR-810
CAR-811
CAR-812
CAR-813
CAR-814
CAR-815
CAR-816
CAR-817
CAR-818
CAR-819
CAR-820
CAR-821
CAR-822
CAR-823
CAR-824
CAR-825
CAR-826
CAR-827
CAR-828
CAR-829
CAR-830
CAR-831
CAR-832
CAR-833
CAR-834
CAR-835
CAR-836
CAR-837
CAR-838
CAR-839
CAR-840
CAR-841
CAR-842
CAR-843
CAR-844
CAR-845
CAR-846
CAR-847
CAR-848
CAR-849
CAR-850
CAR-851
CAR-852
CAR-853
CAR-854
CAR-855
CAR-856
CAR-857
CAR-858
CAR-859
CAR-860
CAR-861
CAR-862
CAR-863
CAR-864
CAR-865
CAR-866
CAR-867
CAR-868
CAR-869
CAR-870
CAR-871
CAR-872
CAR-873
CAR-874
CAR-875
CAR-876
CAR-877
CAR-878
CAR-879
CAR-880
CAR-881
CAR-882
CAR-883
CAR-884
CAR-885
CAR-886
CAR-887
CAR-888
CAR-889
CAR-890
CAR-891
CAR-892
CAR-893
CAR-894
CAR-895
CAR-896
CAR-897
CAR-898
CAR-899
CAR-900
CAR-901
CAR-902
CAR-903
CAR-904
CAR-905
CAR-906
CAR-907
CAR-908
CAR-909
CAR-910
CAR-911
CAR-912
CAR-913
CAR-914
CAR-915
CAR-916
CAR-917
CAR-918
CAR-919
CAR-920
CAR-921
CAR-922
CAR-923
CAR-924
CAR-925
CAR-926
CAR-927
CAR-928
CAR-929
CAR-930
CAR-931
CAR-932
CAR-933
CAR-934
CAR-935
CAR-936
CAR-937
CAR-938
CAR-939
CAR-940
CAR-941
CAR-942
CAR-943
CAR-944
CAR-945
CAR-946
CAR-947
CAR-948
CAR-949
CAR-950
CAR-951
CAR-952
CAR-953
CAR-954
CAR-955
CAR-956
CAR-957
CAR-958
CAR-959
CAR-960
CAR-961
CAR-962
CAR-963
CAR-964
CAR-965
CAR-966
CAR-967
CAR-968
CAR-969
CAR-970
CAR-971
CAR-972
CAR-973
CAR-974
CAR-975
CAR-976
CAR-977
CAR-978
CAR-979
CAR-980
CAR-981
CAR-982
CAR-983
CAR-984
CAR-985
CAR-986
CAR-987
CAR-988
CAR-989
CAR-990
CAR-991
CAR-992
CAR-993
CAR-994
CAR-995
CAR-996
CAR-997
CAR-998
CAR-999
CAR-1000

【圖 8】