



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 107406517 B

(45)授权公告日 2020.05.12

(21)申请号 201680013844.7

(22)申请日 2016.03.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107406517 A

(43)申请公布日 2017.11.28

(30)优先权数据
1503742.7 2015.03.05 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2016/050574 2016.03.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/139487 EN 2016.09.09

(73)专利权人 UCL商务有限公司
地址 英国伦敦

(72)发明人 M.普莱 L.梅卡欧伊
P.阿姆罗利亚 S.高拉希安
A.克雷默 G.程

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 102421800 A,2012.04.18,全文.

CN 104159909 A,2014.11.19,说明书实施例1.

WO 2014184143 A1,2014.11.20,说明书第2
页第23行至第3页第15行,第5页第21行至6页第
12行,第6页第13行至第9页第9行.

James N. Kochenderfer等.Construction
and Pre-clinical Evaluation of an Anti-
CD19 Chimeric Antigen Receptor.《J
Immunother.》.2009,第32卷(第7期),689-702.

Shannon L. Maude等.Chimeric Antigen
Receptor T Cells for Sustained Remissions
in Leukemia.《The new england journal of
medicine》.2014,第371卷(第16期),1507-1517.

审查员 武雪梅

权利要求书2页 说明书16页

序列表32页 附图11页

(54)发明名称

包含CD19结合域的嵌合抗原受体(CAR)

(57)摘要

提供了包含CD19结合域的嵌合抗原受体
(CAR),所述CD19结合域包含a)重链可变区(VH),
所述重链可变区具有含有以下序列的互补决定
区(CDR):CDR1-GYAFSSS(SEQ ID No.1);CDR2-
YPGDED(SEQ ID No.2)CDR3-SLLYGDYLDY(SEQ ID
No.3);和b)轻链可变区(VL),所述轻链可变区具
有含有以下序列的CDR:CDR1-SASSSVSYMH(SEQ
ID No.4);CDR2-DTSKLAS(SEQ ID No.5)CDR3-
QQWNINPLT(SEQ ID No.6)。还提供了包含此类
CAR的细胞,和此类细胞在治疗癌症,特别地B细
胞恶性肿瘤中的用途。

1. 包含CD19结合域的嵌合抗原受体 (CAR), 所述CD19结合域包含:
 - a) 重链可变区 (VH), 所述重链可变区具有由以下序列组成的互补决定区 (CDR):
CDR1-GYAFSSS (SEQ ID No.1);
CDR2-YPGDED (SEQ ID No.2);
CDR3-SLLYGDYLDY (SEQ ID No.3); 和
 - b) 轻链可变区 (VL), 所述轻链可变区具有由以下序列组成的CDR:
CDR1-SASSSVSYMH (SEQ ID No.4);
CDR2-DTSKLAS (SEQ ID No.5);
CDR3-QQWNINPLT (SEQ ID No.6)。
2. 根据权利要求1的CAR, 其中所述CD19结合域包含由SEQ ID No.7所示序列组成的VH域和由SEQ ID No.8所示序列组成的VL域。
3. 根据权利要求1的CAR, 其中所述CD19结合域由SEQ ID No.9所示序列组成。
4. 根据权利要求1的CAR, 其中所述CD19结合域和跨膜域是通过CD8茎间隔物连接的。
5. 根据权利要求1的CAR, 其包含胞内T细胞信号传导域; 其中所述胞内T细胞信号传导域包含
41BB胞内域和CD3-Zeta胞内域。
6. 根据权利要求1的CAR, 其由如SEQ ID No.10至15中任一项所示的序列组成。
7. 根据权利要求1的CAR, 其在由T细胞表达并且用于靶向表达CD19的细胞时, 引起比由表达包含以下的CD19结合域的CAR的T细胞引起的更低的由表达CD19的靶细胞的IFN γ 释放, 所述CD19结合域包含:
 - a) 重链可变区 (VH), 其具有由以下序列组成的互补决定区 (CDR):
CDR1-GVSLPDY (SEQ ID No.16);
CDR2-WGSET (SEQ ID No.17);
CDR3-HYYYGGSYAMDY (SEQ ID No.18); 和
 - b) 轻链可变区 (VL), 所述轻链可变区具有由以下序列组成的CDR:
CDR1-RASQDISKYLN (SEQ ID No.19);
CDR2-HTSRLHS (SEQ ID No.20);
CDR3-QQGNTLPYT (SEQ ID No.21)。
8. 根据权利要求1的CAR, 其中所述CDR是植入到人或人源化框架上的。
9. 核酸序列, 其编码根据前述权利要求1-8中任一项的CAR。
10. 载体, 其包含根据权利要求9的核酸序列。
11. 细胞, 其包含根据权利要求1至8中任一项的CAR。
12. 细胞组合物, 其包含多个根据权利要求11的细胞。
13. 用于制备 (i) 根据权利要求11的细胞的方法, 其包括用根据权利要求10的载体转导或转染细胞的步骤; 或 (ii) 根据权利要求12的细胞组合物的方法, 其包括用根据权利要求10的载体离体转导或转染来自受试者的细胞样品的步骤。
14. 药物组合物, 其包含根据权利要求11的细胞, 或根据权利要求12的细胞组合物, 以及稀释剂。
15. 根据权利要求11的细胞、根据权利要求12的细胞组合物或根据权利要求14的药物

组合物在用于制备治疗B细胞恶性肿瘤的药物的用途。

包含CD19结合域的嵌合抗原受体 (CAR)

发明领域

[0001] 本发明涉及结合B淋巴细胞抗原CD19 (分化簇19) 的嵌合抗原受体 (CAR)。表达此类CAR的T细胞可用于治疗癌性疾病,如B细胞白血病和淋巴瘤。

[0002] 发明背景

[0003] 嵌合抗原受体

[0004] 传统上,抗原特异性T细胞是通过天然对靶抗原特异性的外周血T细胞的选择性扩增产生的。然而,选择和扩增对大多数癌症抗原特异性的大量T细胞是困难且常常是不可能的。使用整合载体的基因治疗为我们提供了这个问题的解决方法:嵌合抗原受体 (CAR) 的转基因表达允许通过外周血T细胞的混合群体 (bulk population) 的离体病毒载体转导容易地产生对任何表面抗原特异性的大量T细胞。

[0005] 这些分子的最常见形式是源自识别靶抗原的单克隆抗体的单链可变片段 (scFv) 经由间隔物和跨膜域融合到信号传导胞内域 (endodomain) 的融合物。此类分子响应由scFv对其关联靶物的识别而导致T细胞的活化。当T细胞表达此类CAR时,它们识别并杀死表达靶抗原的靶细胞。已经开发了针对肿瘤相关抗原的几种CAR,并且使用此类表达CAR的T细胞的过继转移方法目前在用于治疗各种癌症的临床试验中。然而,迄今为止,CAR疗法的主要临床探索和潜在应用是B细胞恶性的治疗。

[0006] 针对CD19的CAR

[0007] CD19是一种B细胞抗原,其在B细胞分化中非常早地表达,并且仅在末端B细胞分化为浆细胞时丧失。因此,除了多发性骨髓瘤之外,所有B细胞恶性肿瘤上都表达CD19。它不在其它造血群体或非造血细胞上表达,因此靶向该抗原不应导致对骨髓或非造血器官的毒性。在治疗淋巴样恶性肿瘤时,正常B细胞区室的损失被认为是可接受的毒性,因为虽然有效的CD19 CAR T细胞疗法将导致B细胞不发育 (aplasia),因此可以用合并的免疫球蛋白治疗随后的低丙种球蛋白血症 (hypogammaglobulinaemia)。

[0008] 因此,CD19是有吸引力的CAR靶物。到目前为止,CAR领域的主要临床焦点是靶向难治性B细胞癌上的CD19的研究,如表1中汇总。

[0009] 已经在不同的中心针对CD19测试了CAR的不同设计,如表1中概述:

[0010]	中心	结合剂	胞内域	评述
	伦敦大学学院	Fmc63	CD3-Zeta	低水平短暂持续性
	Memorial Sloane Kettering	SJ25C1	CD28-Zeta	短期持续性
	NCI/KITE	Fmc63	CD28-Zeta	长期低水平持续性
	Baylor, Centre for Cell and Gene Therapy	Fmc63	CD3-Zeta/ CD28-Zeta	短期低水平持续性
	UPENN/Novartis	Fmc63	41BB-Zeta	长期高水平持续性

[0011] 表1:靶向CD19的CAR经验的汇总

[0012] 大多数研究测试了基于源自杂交瘤fmc63的scFv的CD19 CAR。最有希望的是治疗急性成淋巴细胞性白血病(ALL, Acute Lymphoblastic Leukaemia)。

[0013] 针对CD19的CAR的临床经验

[0014] CD19指导性CAR疗法在ALL中表现最为有效。Memorial Sloane Kettering (Brentjens, et al. (2013) Leukemia. Sci. Transl. Med. 5, 177ra38) 和宾夕法尼亚大学的团队在2013年春季发表了ALL的第一项研究。最近已经进行了后一研究的更新报告 (Maude et al. (2014) N. Engl. J. Med. 371, 1507-1517)。这里, 治疗了25岁龄下的25名患者和超过此年龄的5名患者。90%在一个月时实现了完全响应, 并且28例可评估病例的22例实现了MRD阴性状态, 并且6个月无事件存活率为67%。研究后15例患者不接受进一步疗法。

[0015] Brentjens等人(如上)在成人背景中, 用逆转录病毒转导以表达CD19 CAR的自体T细胞治疗5例ALL患者(2例难治性复发性患者、2例MRD阳性疾病患者、和1例MRD阴性患者), 所述CD19 CAR掺入源自SJ25C1杂交瘤的scFv和CD28共刺激域。所有这些都实现了深刻的分子缓解, 使这些患者中的4名能够接受异基因(allogeneic) SCT。这排除了响应持续性的评估, 但是CAR T细胞仅在输注后在血液或骨髓中可检测3-8周。未移植的患者在90天时复发CD19+疾病。随后, Davila et al. ((2014). Sci. Transl. Med. 6, 224ra25) 更新了此分组。16名成年患者中的14名患者在CAR T细胞输注点时具有可检测的疾病, 尽管采用挽救化疗和环磷酰胺调理。16例中的14例实现完全缓解, 有或没有计数恢复, 包括9名在挽救化疗后可检测到残留疾病的形态学证据的患者中的7名。16名患者中的12名实现MRD阴性, 并且这允许7名在发表时经历异基因移植。响应在一些患者中可持续, 其中8名非移植患者中的4名在长达24个月的随访时持续形态学缓解, 尽管该分组的存活曲线尚不稳定。

[0016] 一项在主要为ALL的儿科和年轻成人患者分组中的最近发表的研究提供了对其结果的第一个意向治疗分析。这可以有助于消除在排除未接受预期剂量的CAR T细胞的患者中固有的偏倚 (Lee et al. (2014) Lancet. doi:10.1016/S0140-6736(14)61403-3)。用含有CD28域的第二代CAR治疗21名患者。除2名患者外, 所有患者均接受了预期的T细胞剂量, 突出显示了将该治疗递送给具有难治性或多复发性ALL的患者的可行性。该研究显示以下功效: 67%达到完全缓解, 并且60%的ALL患者实现MRD阴性状态。

[0017] CD19 CAR疗法的免疫毒性

[0018] 细胞因子释放综合征 (CRS) 涵盖一系列炎症症状, 从轻度变化至多器官耗竭伴低血压和呼吸耗竭。在用 CD19 CAR T 细胞治疗的患者中通常发生一定程度的 CRS。在最近分组中治疗的约 30% (21/73) 患者显示一定程度的 CRS (Davilia et al (2014) 同上; Lee et al (2014) 同上; Kochenderfer (2014) J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025)。在用识别 CD19 和 CD3 两者的双特异性重组单链抗体博纳吐单抗 (blinatumomab) 治疗的患者中也观察到 CRS。CRS 通常在 CAR T 细胞输注后 5-21 天出现。

[0019] CRS 可以是危及生命的, 并且需要在重症监护背景中治疗。CRS 与升高的血清细胞因子水平相关。最显著升高的细胞因子是 IL-6、IL-10 和干扰素 γ (IFN γ)。严重 CRS 的临床表现 (发热、肝脾大、凝血病和高铁蛋白血症) 类似于例如在 T 细胞中先天性缺陷患者中发现的巨噬细胞活化综合征 (MAS)。这表明涉及共同的免疫病理过程。目前尚不清楚哪种细胞类型 (CAR T 细胞、濒死肿瘤细胞或局部活化的巨噬细胞) 负责关键细胞因子, 特别是 IL-6 的产生。然而, MAS 中的一种关键的起始因素是释放大量的干扰素- γ (López-Alvarez et al. (2009). Clin. Vaccine Immunol. CVI 16, 142-145)。

[0020] 神经毒性

[0021] 研究所间的 CD19 CAR 研究中的许多患者形成了短暂的神经毒性, 具有一系列从失语至迟钝、谵妄和癫痫发作的严重程度 (Davilia et al (2014) 同上)。这似乎限于 ALL 患者, 并且在博纳吐单抗疗法后已经记录了类似的综合征。脑成像似乎是正常的。神经毒性可以反映高水平的穿过血脑屏障的系统性细胞因子。

[0022] 持续性、复发和 T 细胞耗竭

[0023] 持续响应似乎与循环 CAR 转导的 T 细胞的较高的峰水平以及 B 细胞不发育的持续时间相关。除 CD19 疾病复发患者外, 复发通常与循环 CAR T 细胞的丧失和正常 B 细胞的恢复相关。

[0024] T 细胞耗竭是许多慢性感染和癌症中出现的 T 细胞功能障碍的状态。它由效应细胞功能不良、抑制性受体的持续表达和与功能性效应细胞或记忆 T 细胞的转录状态不同的转录状态定义。耗竭防止感染和肿瘤的最佳控制。最近, 已经出现了耗竭的 T 细胞的功能和表型谱的更清晰的图片, 其中抑制性受体程序性死亡 1 (PD-1; 也称为 PDCD1) (活化的 T 细胞的负调节物) 的表达是关键的特征 (Day et al. (2006) Nature 443, 350-354)。

[0025] CD19 CAR 研究中的响应表明, T 细胞以高水平持续延长的时段似乎在实现持久的响应中是重要的。减少 T 细胞耗竭的 CD19 CAR 可以导致临床响应的改善。

[0026] 因此, 需要与上述缺点不相关的针对 CD19 的替代 CAR。

附图说明

[0027] 图 1: 注释和编号的 (a) CAT19 VH 序列; (b) CAT19 VL

[0028] VH 和 VL 的序列使用 Chothia 编号进行编号。显示了框架和 CDR 区。也显示插入。

[0029] 图 2: 用重组 CAT19 染色 CD19 阳性细胞

[0030] SupT1 细胞通常不表达 CD19, 但在本研究中工程化改造为如此。将 CAT19 VH 和 VL 序列克隆入小鼠 IgG2a 重链形式和小鼠 κ 轻链形式中, 均在哺乳动物表达质粒中。用重链和轻链两者同时转染 293T 细胞, 并且用蛋白 A 纯化所得到的抗体。用该重组抗体 (或简单的 293T 上清液) 对 SupT1 细胞和 SupT1.CD19 细胞进行染色, 并进一步用荧光缀合的抗小鼠二抗染

色。可以通过流式细胞术检测重组CAT19抗体的结合。

[0031] 图3:用CAT19 scFv染色CD19阳性细胞

[0032] 克隆CAT19的VH和VL,使得它们形成scFv,由此通过(SGGGS)₃接头分开VH和VL。使用VH-VL和VL-VH方向的CAT scFv产生两种scFv。另外,从抗CD19抗体fmc63和4g7产生ScFv,也以任一方向生成。(a) scFv显示形式:这是一种逆转录病毒载体,其中将scFv克隆到具有CD8跨膜域和CD8胞内域的前12个残基的人IgG1 Fc间隔物上。这继而与FMD-2A肽TaV和截短的人CD34框架符合读码框。以这种方式,在细胞的表面上展示scFv,并且可以通过单独检测CD34控制转基因表达。产生SupT1细胞,其表达6种不同的scFv形式之任一种,并且用重组人截短的CD19-小鼠IgG2a Fc融合物和抗-CD34染色这些细胞;(b) 用fmc63 VH-VL和VL-VH形式染色;(c) 用4g7 VH-VL和VL-VH形式染色;和(d) 用CAT19 VH-VL和VL-VH形式染色。令人惊奇的是,CAT19VH-VL scFv良好地结合,而VL-VH scFv给出了显著较少的可检测的结合。

[0033] 图4:测试的不同代的CAR和初始CAR

[0034] (a) 包含抗原结合域(其最通常是scFv)、间隔物域、跨膜域和一个或几个信号传导域的典型CAR形式。(b) 第一代CAR传送活化信号;其胞内域源自FcGamma受体胞内域或CD3Zeta胞内域;(c) 第二代受体传送两个信号:其胞内域包含与CD3-Zeta的胞内域连接的共刺激域。共刺激域通常是CD28的胞内域、OX40的胞内域或41BB的胞内域。(d) 第三代受体传送三个信号:其胞内域包含CD28胞内域与41BB胞内域和与CD3-Zeta胞内域,或CD28胞内域与OX40胞内域和与CD3-Zeta胞内域的融合物。(e) 最初测试的基于CAT19的CAR,其包含VH-VL方向的scFv、CD8茎间隔物和包含41BB-Zeta的第二代胞内域(Campana CAR形式)。

[0035] 图5:CAT19 CAR功能与fmc36 CAR的体外比较

[0036] 用编码Campana形式的CAT19 CAR的慢病毒载体或Campana CAR本身转导来自5个不同供体的原代人T细胞。然后,将这些T细胞用于各种测定法。(a) 对SupT1细胞进行铬释放测定法。这些细胞是CD19阴性。CAR T细胞都不响应该细胞系(虚线)。对SupT1.CD9进行铬释放测定法。这两种CAR对该细胞系表现得相等(实现)。接着,使用针对SupT1或SupT1.CD19的NT T细胞、fmc63 CAR T细胞或CAT19 CAR T细胞进行脱粒测定法。(b) 在CD4⁺ T细胞上同控的数据,和(c) 显示了CD8⁺ T细胞。使用CAR19 CAR T细胞增加脱粒。(d) 使用氘化胸苷掺入估算增殖。针对SupT1.CD19测试NT、fmc63 CAR T细胞、CAT19 CAR T细胞。在此实验中,还测试了靶向GD2的无关CAR。使用CAR19 CAR T细胞有增加的增殖的趋势。(e) 针对SupT1或SupT1.CD19细胞的激发(challenge)后24小时,从NT T细胞、fmc63 CAR T细胞、CAT19 CAR T细胞或GD2 CAR T细胞中的干扰素- γ 释放。当用CD19+靶物进行激发时,CAT19 CAR T细胞比fmc63 CAR T细胞产生显著更少的IF- γ 。

[0037] 图6:CAT19功效的体内模型。

[0038] (a) 体内模型的实验设置概要。通过尾静脉注射给NSG小鼠注射 2.5×10^5 个Raji.FLuc细胞。24小时后,通过尾静脉施用 4×10^6 个NT原代人T细胞或用fmc63 CAR转导的T细胞或用CAT19 CAR转导的T细胞。通过生物发光成像顺序测量肿瘤响应。在第4天取样尾静脉血,用于植入和血清细胞因子。在第11天淘汰动物,并且对组织研究CAR T细胞的持久性和肿瘤负荷。(b) 在第10天对不同小鼠分组的生物发光成像。在用NT T细胞处理的小鼠的骨盆、脊柱、肋骨、颅骨和脾脏中观察到广泛的疾病,而在接受CAT19 CAR T细胞或fmc63CAR T细胞的小鼠中最小的信号是明显的。(c) 随时间从不同的小鼠分组取平均的定量生物发光

信号。Y轴是对数标尺；在接受NT T细胞的小鼠和接受CAR T细胞的小鼠中的信号积累之间看到明显的差异。在接受fmc63 CAR T细胞或CAT19 CAR T细胞的小鼠中没有看到信号积累的差异。(d) 在实验结束时来自小鼠的骨髓中的流式细胞术确定的肿瘤负荷。实际上，在接受fmc63或CAT19 CAR T细胞的小鼠的骨髓中未能检测到Raji细胞。

[0039] 图7:体内持续的CAR T细胞的表征

[0040] (a) 在上文概述的模型中来自用fmc63 CAR T细胞或CAT19 CAR T细胞处理的动物的小鼠脾脏中的CAR T细胞的绝对数目。这显示了相同数目存在于这两者中；(b) 用fmc63 CAR T细胞或CAT19 CAR T细胞处理的小鼠骨髓中CAR T细胞的绝对数目。这显示了相同数目的细胞存在于这两者中；(c) 用fmc63 CAR T细胞或CAT19 CAR T细胞处理的小鼠的脾脏和(d) 骨髓中表达PD1的CAR T细胞的绝对数目。在两个区室中较少的CAT19 T细胞为PD1+。

[0041] 发明概述

[0042] 本发明人已经开发出具有先前尚未描述的CDR的新型CD19特异性CAR。它与用于UPENN研究中的基于fmc63的CAR具有等同的效力，但是导致降低的毒性和降低的T细胞耗竭。

[0043] 因此，在第一方面，本发明提供了包含CD19结合域的嵌合抗原受体(CAR)，所述CD19结合域包含a) 具有含有以下序列的互补决定区(CDR)的重链可变区(VH)：

[0044] CDR1-GYAFSSS (SEQ ID No.1)；

[0045] CDR2-YPGDED (SEQ ID No.2)

[0046] CDR3-SLLYGDYLDY (SEQ ID No.3)；和

[0047] b) 具有含有以下序列的CDR的轻链可变区(VL)：

[0048] CDR1-SASSSVSYMH (SEQ ID No.4)；

[0049] CDR2-DTSKLAS (SEQ ID No.5)

[0050] CDR3-QQWNINPLT (SEQ ID No.6)。

[0051] CD19结合域可以包含具有如SEQ ID No.7所示的序列的VH域和/或具有如SEQ ID No.8所示的序列的VL域，或其具有至少95%序列同一性的变体。

[0052] CD19结合域可以包含方向VH-VL的scFv。

[0053] CD19结合域可以包含如SEQ ID No.9所示的序列或其具有至少95%序列同一性的变体。

[0054] CD19结合域可以包含植入到人抗体框架上的权利要求1中限定的6个CDR。

[0055] CD19结合域和跨膜域可以通过间隔物连接的，所述间隔物可以包含下列之一：人IgG1 Fc域；IgG1铰链；或CD8茎。间隔物可以包含CD8茎。

[0056] CAR可以包含胞内T细胞信号传导域或与胞内T细胞信号传导域结合。

[0057] 胞内T细胞信号传导域可以包含下列胞内域的一项或多项：CD28胞内域；41BB胞内域、OX40胞内域和CD3-Zeta胞内域。

[0058] 特别地，CAR可以包含CD8茎间隔物和胞内T细胞信号传导域，其包含41BB胞内域和CD3-Zeta胞内域。

[0059] 特别地，CAR可以包含CD8茎间隔物和胞内T细胞信号传导域，其包含OX40胞内域和CD3-Zeta胞内域。

[0060] 在一个备选的实施方案中，胞内T细胞信号传导域可以包含全部以下胞内域：CD28

胞内域;OX40和CD3-Zeta胞内域。

[0061] CAR可以包含如SEQ ID No.10至15中任一项所示的序列或其具有至少80%序列同源性但保持i) 结合CD19并且ii) 诱导T细胞信号传导的能力的变体。与用于UPENN研究的基于fmc63的CAR相比,所述CAR可以具有有利的特性。例如,CAR在由T细胞表达并且用于靶向CD19表达细胞时可以引起比由表达包含CD19结合域的CAR的T细胞引起的更低的由表达CD19的靶细胞的IFN γ 释放,所述CD19结合域包含:a) 具有含有以下序列的互补决定区(CDR)的重链可变区(VH):CDR1-GVSLPDY(SEQ ID No.16);CDR2-WGSET(SEQ ID No.17);CDR3-HYYYGGSYAMDY(SEQ ID No.18);和b) 具有含有以下序列的CDR的轻链可变区(VL):CDR1-RASQDISKYLN(SEQ ID No.19);CDR2-HTSRLHS(SEQ ID No.20)CDR3-QQGNTLPYT(SEQ ID No.21)。CDR可以是植入到人或人源化框架上的。

[0062] 在第二个方面,本发明提供了核酸序列,其编码根据本发明的第一方面的CAR。

[0063] 在第三个方面,提供了载体,其包含根据本发明的第二个方面的核酸序列。

[0064] 在第三个方面,提供了细胞,其包含根据本发明的第一个方面的CAR。

[0065] 细胞可以是细胞溶解免疫细胞,诸如T细胞或天然杀伤(NK)细胞。

[0066] 在第四个方面,提供了细胞组合物,其包含多个根据本发明的第三个方面的细胞。

[0067] 在第五个方面,提供了用于制备根据第三个方面的细胞的方法,其包括用根据第三个方面的载体转导或转染细胞的步骤。

[0068] 在第六个方面,提供了用于制备根据第四个方面的细胞组合物的方法,其包括用根据第三个方面的载体离体转导或转染来自受试者的细胞样品的步骤。

[0069] 例如,细胞样品可以是血液样品或其衍生物,如外周血单核细胞(PBMC)样品。

[0070] 在第七个方面,提供了药物组合物,其包含根据本发明的第一个方面的细胞,或根据本发明的第四个方面的细胞组合物,以及药学可接受载体、稀释剂或赋形剂。

[0071] 在第八个方面,提供了用于治疗癌症的方法,其包括对受试者施用根据本发明的第一个方面的细胞、根据本发明的第四个方面的细胞组合物或根据本发明的第七个方面的药物组合物的步骤。

[0072] 方法可以包括用根据本发明的第三个方面的载体离体转导或转染来自受试者的细胞,然后将经转染的细胞或一些经转染的细胞施用回所述受试者的步骤。

[0073] 还提供了根据本发明的第七个方面的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0074] 还提供了根据本发明的第三个方面的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0075] 例如,癌症可以是B细胞恶性肿瘤。

[0076] 发明详述

[0077] 嵌合抗原受体(CAR)

[0078] 嵌合抗原受体(CAR),也称为嵌合T细胞受体、人工T细胞受体和嵌合免疫受体,是将任意特异性植入免疫效应细胞上的工程化受体。在经典的CAR中,将单克隆抗体的特异性植入T细胞上。可以使用例如逆转录病毒载体将CAR编码核酸转移到T细胞。这样,可以产生大量癌症特异性T细胞用于过继细胞转移。该方法的I期临床研究显示功效。

[0079] CAR的靶抗原结合域通常通过间隔物和跨膜域融合到胞内域。胞内域可以包含胞内T细胞信号传导域或与胞内T细胞信号传导域结合。当CAR结合靶抗原时,这导致将活化信

号传送到上面有其表达的T细胞。

[0080] 本发明的CAR包含基于小鼠抗CD19单克隆抗体的CD19结合域。

[0081] 本发明的CAR包含CD19结合域,其包含:

[0082] a) 重链可变区 (VH), 其具有含有以下序列的互补决定区 (CDR):

[0083] CDR1-GYAFSSS (SEQ ID No.1);

[0084] CDR2-YPGDED (SEQ ID No.2)

[0085] CDR3-SLLYGDYLDY (SEQ ID No.3); 和

[0086] b) 轻链可变区 (VL), 所述轻链可变区具有含有以下序列的CDR:

[0087] CDR1-SASSSVSYMH (SEQ ID No.4);

[0088] CDR2-DTSKLAS (SEQ ID No.5)

[0089] CDR3-QQWNINPLT (SEQ ID No.6)。

[0090] 可以有可能将一个或多个突变(取代、添加或缺失)引入每个CDR中,而不负面影响CD19结合活性。每个CDR可以例如具有一个、两个或三个氨基酸突变。

[0091] CDR可以为单链可变片段(scFv)的形式,其是抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)经由10至约25个氨基酸的短接头肽连接的融合蛋白。scFv可以是方向VH-VL,即VH位于CAR分子的氨基末端,并且VL域与间隔物,继而与跨膜域和胞内域连接。

[0092] CDR可以植入到人抗体或scFv的框架上。例如,本发明的CAR可以包含由以下序列之一组成或包含以下序列之一的CD19结合域

[0093] 本发明的CAR可以包含以下VH序列:

[0094] SEQ ID No.7-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0095] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKGFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSS

[0096] 本发明的CAR可以包含以下VL序列:

[0097] SEQ ID No.8-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0098] QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKR

[0099] 本发明的CAR可以包含以下scFv序列:

[0100] SEQ ID No.9-来自鼠单克隆抗体的VH-VL scFv序列

[0101] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKGFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSIQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKR

[0102] CAR可以由以下序列之一组成或包含以下序列之一:

[0103] SEQ ID No.10-使用“Campana”构造的CAT19C AR(参见实施例)

[0104] MGTSLLCWMALCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEDTNYSKGFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSIQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELR

VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0105] SEQ ID No.11-具有OX40-Zeta胞内域的CAT19 CAR

[0106] MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKRPGKGLEWI
GRIYPGEDTNYSGKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGT
SYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSR
SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0107] SEQ ID No.12-具有CD28-Zeta胞内域的CAT19 CAR

[0108] MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKRPGKGLEWI
GRIYPGEDTNYSGKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGT
SYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRV
KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
RRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0109] SEQ ID No.13-第三代CD19 CAR

[0110] MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKRPGKGLEWI
GRIYPGEDTNYSGKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGT
SYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
RSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0111] SEQ ID No.14-具有IgG1铰链间隔物的CD19 CAR

[0112] MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKRPGKGLEWI
GRIYPGEDTNYSGKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGT
SYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCPKDPKFWVLVVVGGVLACYS
LLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPR

[0113] SEQ ID No.15-具有人IgG1的铰链-CH2-CH3的CD19 CAR,其中FcR结合位点突变

[0114] MGTSLLCWMALCCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKRPGKGLEWI
GRIYPGEDTNYSGKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGT
SYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT

LMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSLFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0115] 本发明的CAR可以包含如SEQ ID No.7,8,9,10,11,12,13,14或15所示的序列的变体,其具有至少80,85,90,95,98或99%序列同一性,条件是变体序列保留结合CD19的能力(当与互补的VL或VH域(若合适的话)一起时)。

[0116] 可以通过诸如BLAST(其可以在<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>免费获得)的程序容易地确定两个多肽序列之间的百分比同一性。

[0117] 跨膜域

[0118] 本发明的CAR还可以包含跨膜的跨膜域。它可以包含疏水性 α 螺旋。跨膜域可以源自CD28,其具有良好的受体稳定性。

[0119] 跨膜域可以包含如SEQ ID No.22所示的序列。

[0120] SEQ ID No.22

[0121] FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV

[0122] 胞内T细胞信号传导域(胞内域)

[0123] 胞内域是CAR的信号传送部分。在抗原识别后,受体簇和信号传送给细胞。最常用的胞内域组分是含有3个ITAM的CD3-zeta的组分。这在抗原结合后将活化信号传送给T细胞。CD3-zeta不能提供完全有能力的活化信号,并且可能需要额外的共刺激信号传导。例如,来自CD28或OX40或41BB的胞内域可以与CD3-Zeta一起使用以传送增殖/存活信号,或者所有三者可以一起使用。

[0124] 早期的CAR设计具有从Fc ϵ R1或CD3 ζ 的 γ 链的胞内部分衍生的胞内域。因此,这些第一代受体传送免疫信号1,其足以触发T细胞对关联靶细胞的杀伤,但不能完全活化T细胞以增殖和存活。为了克服这个限制,构建了复合胞内域。T细胞共刺激分子的细胞内部分与CD3 ζ 的细胞内部分的融合产生第二代受体,其可以在抗原识别之后同时传送活化和共刺激信号。最常用的共刺激域是CD28的共刺激域。这提供了最有力的共刺激信号,即免疫信号2,其触发T细胞增殖。还描述了一些受体,其包括传送存活信号的TNF受体家族胞内域,如OX40和41BB。最后,描述了甚至更有力的第三代CAR,其具有能够传送活化、增殖和存活信号的胞内域。图4中总结了CAR及其不同代。

[0125] 本发明的CAR的胞内域可以包括CD3-Zeta胞内域、41BB胞内域、OX40胞内域或CD28胞内域中的一个或多个的组合。

[0126] 本发明的CAR的胞内T细胞信号传导域(胞内域)可以包含如SEQ ID No.23,24,25,26,27,28,29或30所示的序列,或其具有至少80%序列同一性的变体。

[0127] SEQ ID No.23 (CD3zeta胞内域)

[0128] RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0129] SEQ ID No.24 (41BB胞内域)

[0130] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

- [0131] SEQ ID No.25 (OX40胞内域)
- [0132] RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
- [0133] SEQ ID No.26 (CD28胞内域)
- [0134] KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY
- [0135] 此类胞内域的组合的实例包括41BB-Z、OX40-Z、CD28-Z和CD28-OX40-Zeta。
- [0136] SEQ ID No.27 (41BB-Z胞内域融合物)
- [0137] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0138] SEQ ID No.28 (OX40-Z胞内域融合物)
- [0139] RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0140] SEQ ID No.29 (CD28Z胞内域融合物)
- [0141] KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0142] SEQ ID No.30 (CD28OXZ)
- [0143] KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0144] 变体序列可以与SEQ ID No.22,23,24,25,26,27,28,29或30具有至少80%,85%,90%,95%,98%或99%的序列同一性,条件是该序列提供了有效的跨膜域/胞内T细胞信号传导域。
- [0145] 信号肽
- [0146] 本发明的CAR可以包含信号肽,使得当CAR在诸如T细胞的细胞内表达时,将新生蛋白质引导到内质网并且随后到表达其的细胞表面。
- [0147] 信号肽的核心可以含有长的疏水性氨基酸区段,其具有形成单个 α -螺旋的倾向。信号肽可以以氨基酸的短正电荷区段开始,这有助于在移位期间强制多肽的适当拓扑学。在信号肽的末端,通常有被信号肽酶识别和切割的氨基酸区段。信号肽酶可以在移位期间或完成后切割,以产生游离信号肽和成熟蛋白。然后,游离信号肽被特异性蛋白酶消化。
- [0148] 信号肽可以在分子的氨基末端。
- [0149] 本发明的CAR可以具有以下通式:
- [0150] 信号肽-CD19结合域-间隔物域-跨膜域/胞内T细胞信号传导域。
- [0151] 信号肽可以包含SEQ ID No.31或其具有5、4、3、2或1个氨基酸突变(插入、取代或添加)的变体,条件是信号肽仍然发挥功能以引起CAR的细胞表面表达。
- [0152] SEQ ID No.31:METDTLLLWVLLWVPGSTG
- [0153] SEQ ID No.31的信号肽是紧凑且高效的。预期在末端甘氨酸后给出约95%的切割,产生通过信号肽酶的有效除去。

[0154] 间隔物

[0155] 本发明的CAR可以包含间隔物序列以连接CD19结合域与跨膜域并且在空间上分开CD19结合域与胞内域。柔性间隔物允许CD19结合域在不同方向上取向以实现CD19结合。

[0156] 间隔物序列可以例如包含IgG1 Fc区、IgG1铰链或CD8茎、或其组合。或者,间隔物可以包含具有与IgG1 Fc区、IgG1铰链或CD8茎类似的长度和/或域间隔性质的备选序列。

[0157] 可以改变人IgG1间隔物以除去Fc结合基序。

[0158] 下文给出了这些间隔物的氨基酸序列的实例:

[0159] SEQ ID No.32 (人IgG1的铰链-CH2CH3)

[0160] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKKD

[0161] SEQ ID No.33 (人CD8茎):

[0162] TTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

[0163] SEQ ID No.34 (人IgG1铰链):

[0164] AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

[0165] SEQ ID No.35 (IgG1铰链-Fc)

[0166] AEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGKKDPK

[0167] SEQ ID No.36 (IgG1铰链-Fc,其修饰为除去Fc受体识别基序)

[0168] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVA*GPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKKDPK

[0169] 经修饰的残基是加下划线的;*表示缺失。

[0170] 干扰素释放和CAT T细胞耗竭

[0171] 本发明人已经发现,基于CAT19 scFv的CD19 CAR具有可导致较低毒性和较好功效的性质。

[0172] 鉴于CD19 CAR疗法的主要经验是基于fmc63 scFv的CAR,并且最久、最大且可能最重大的临床数据集是基于fmc63的Campana CAR,本发明人采用该Campana CAR作为“金标准”。因此,在fmc63-Campana CAR和类似CAR但具有CAT19 scFv而非fmc63之间进行了比较。令人惊奇的是,本发明人发现虽然CAT19 CAR T细胞实现杀死表达CD19的靶细胞,而且响应于表达CD19的靶物而增殖,但是干扰素gamma释放较少。此外,攻击性B细胞淋巴瘤的小动物模型在基于fmc63的和基于CAT19的CAR之间显示相同的功效和相等的植入,但令人惊讶的是,比fmc63 CAR T细胞更少的CAT19 CAR T细胞被耗竭。

[0173] 在涉及使CAR T细胞与靶细胞接触的比较测定法中,本发明的CAR可以导致低25, 50, 70或90%的IFN γ 释放。

[0174] 本发明的CAR可以导致比fmc63 CAR T细胞更小比例的CAR T细胞被耗竭。可以使用本领域已知的方法来评估T细胞耗竭,如PD-1表达的分析。在涉及使CAR T细胞与靶细胞接触的比较测定法中,本发明的CAR可以导致比fmc63 CAR T细胞少20,30,40,50,60或70%的CAR T细胞表达PD-1。

[0175] 核酸序列

[0176] 本发明的第二方面涉及编码本发明第一方面的CAR的核酸序列。

[0177] 核酸序列可以编码具有SEQ ID No.10-15中任一项所示的氨基酸序列的CAR。

[0178] 载体

[0179] 本发明还提供了包含本发明的核酸序列的载体。可以使用此类载体将核酸序列导入宿主细胞中,使得其表达并产生根据本发明第一方面的分子。

[0180] 载体可以是例如质粒或病毒载体,如逆转录病毒载体或慢病毒载体。

[0181] 载体可以能够转染或转导细胞,如T细胞。

[0182] 细胞

[0183] 本发明还提供了包含根据本发明的核酸的细胞。本发明提供在细胞表面表达根据本发明的第一方面的CAR的细胞。

[0184] 细胞可以是细胞溶解免疫细胞,如T细胞或天然杀伤(NK)细胞。

[0185] 可以通过用CAR编码核酸转导或转染细胞来制备能够表达根据本发明的CAR的细胞。

[0186] 本发明的CAR表达细胞可以离体产生。细胞可以来自细胞样品,如来自患者或供体的外周血单核细胞(PBMC)样品。在用CAR编码核酸转导之前,例如通过用抗CD3单克隆抗体处理,可以活化和/或扩增细胞。

[0187] 药物组合物

[0188] 本发明还涉及药物组合物,其含有本发明的一种CAR表达细胞或多种细胞以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂,和任选地一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。此类配制剂可以例如为适合用于静脉输注的形式。

[0189] 治疗方法

[0190] 本发明的CAR表达细胞可以能够杀死癌细胞,如B细胞淋巴瘤细胞。CAR表达细胞,如T细胞或NK细胞可以从患者自己的外周血(第一方)离体产生,或在来自供体外周血的造血干细胞移植(第二方)的设置中产生,或自不相关供体的外周血(第三方)产生。或者, CAR表达细胞可以源自可诱导祖细胞或胚胎祖细胞离体分化成诸如T细胞的细胞。在这些情况中,通过多种手段之一,包括用病毒载体转导、用DNA或RNA转染导入编码CAR的DNA或RNA产生CAR细胞。

[0191] 表达本发明CAR分子的T细胞或NK细胞可用于治疗癌性疾病,特别是与CD19表达相关的癌性疾病。

[0192] 治疗疾病的方法涉及本发明的细胞或细胞群体的治疗用途。在这方面,可以向具有现有疾病或状况的受试者施用细胞以减轻、减少或改善与疾病相关的至少一种症状和/或减缓、减少或阻断疾病进展。本发明的方法可以引起或促进细胞介导的对表达CD19的细胞,如B细胞的杀伤。

[0193] 现在将通过实施例进一步描述本发明,所述实施例旨在用来帮助本领域普通技术

人员实施本发明,而并不意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0194] 实施例1:克隆VH和VL并证明CD19结合

[0195] 从小鼠抗CD19单克隆抗体克隆VH和VL,并且与人 κ 恒定区和人IgG1恒定区以符合读码框的方式融合。将这些嵌合重链和轻链克隆到表达载体中并用于转染293T细胞。随后产生的抗体用于染色SupT1细胞(CD19阴性的T细胞系),以及已被工程化改造为CD19阳性的SupT1细胞。该染色显示CD19的特异性结合(图2)。

[0196] 实施例2:证明VH/VL可以形成结合CD19的scFv

[0197] 然后,研究克隆的VH和VL是否可以以scFv形式结合CD19。将VH和VL作为scFv以两个方向克隆:VH-VL和VL-VH,其中两个可变区由包含(SGGGG) 4的接头分开。将这些scFv克隆到与截短的CD34共表达的非信号传导CAR中,如图3a中所示。简言之,这包括信号肽、scFv、人IgG1的铰链-CH2-CH3、CD8跨膜域、CD8胞内域的前12个残基、FMD-2A肽TeV、截短的人CD34。为了进行比较,来自fmc63的scFv和来自另一抗CD19杂交瘤4g7的scFv在VH-VL和VL-VH方向两者中以相同的形式克隆。

[0198] 这样,可以研究几个参数:(1)通过使用与鼠Fc融合的重组关联靶抗原,靶抗原与CAR的结合,不受由信号传导引起的受体内化(internalization)的阻碍;(2)可以使用多克隆抗Fc测定受体的稳定性;(3)可以通过CD34的共染色来控制盒的表达水平。

[0199] 将这些构建体转入SupT1细胞。产生重组CD19-小鼠IgG2aFc融合物。用与不同荧光团缀合的抗体对SupT1细胞染色小鼠-Fc、人Fc和抗CD34,并且通过流式细胞术询问稳定性/结合。

[0200] 下文详述了所使用的不同scFv的序列:

[0201] >scFv_fmc63_VH-VL (SEQ ID No.37)

[0202] EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI
IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTSSSL
SASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC
QQGNTLPYTFGGGTKLEITKA

[0203] >scFv_fmc63_VL-VH (SEQ ID No.38)

[0204] DIQMTQTSSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT
DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTC
TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY
YYGGSYAMDYWGQGTSTVTSS

[0205] >scFv_4g7_VH-VL (SEQ ID No.39)

[0206] EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKAT
LTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQAAPS
IPVTPGESVSISCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLAGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED
VGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELKR

[0207] >scFv_4g7_VL-VH (SEQ ID No.40)

[0208] DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLAGVPDRFSG

SGSGTAFTLRISRVEADVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELKRSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPELIKPGAS
VKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVY
YCARGTYYYYGSRVFDYWGGTTTLTVSS

[0209] >scFv_CAT_VH-VL (SEQ ID No.9)

[0210] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGDEDTNYSKFKDKAT
LTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPA
IMASPGKEVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQ
WNINPLTFGAGTKLELKR

[0211] >scFv_CAT_VL-VH (SEQ ID No.41)

[0212] QIVLTQSPAIMASPGKEVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTS
YFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPELVKPGASVKISCK
ASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLEWIGRIYPGDEDTNYSKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSL
LYGDYLDYWGGTTTLTVSS

[0213] 在图3中汇总了使用的构建体和染色结果。令人惊讶的是,具有VH-VL方向的scFv
的CAT CAR结合CD19,而具有VL-VH方向的scFv的CAT19 CAR给出最小的CD19结合。这与在HL
和LH两种方向都结合CD19的fmc63 CAR和4g7 CAR形成对比。HL CAT CAR的结合和稳定性表
现得与fmc63的结合和稳定性相等。

[0214] 实施例3:CAT19 CAR功能与fmc36 CAR的体外比较

[0215] 将HL方向的CAT scFv克隆到由Campana设计的CAR支架(Imai et al (2004)
Leuk.Off.J.Leuk.Soc,Am.Leuk,Res.Fund.UK 18:676-684)中。有效地将fmc63 scFv替换
为CAT scFv,并与初始的基于fmc63的CAR进行比较。该CAR包括信号肽、scFv、CD8茎间隔物
和跨膜和41BB和Zeta胞内域。下文给出了CAT CAR和fmc63 CAR的氨基酸序列:

[0216] >CAT19_CAR (SEQ ID No.10)

[0217] MGTSLLCWMALCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLEWI
GRIYPGDEDTNYSKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGGTTTLTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSQIVLTQSPAIMASPGKEVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGT
SYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0218] >Fmc63_CAR,如由Imai et al (2004) 同上描述 (SEQ ID No.42)

[0219] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIY
HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITKAGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNS
KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0220] 用编码Campana形式的CAT19 CAR或fmc63 Campana CAR本身的慢病毒载体转导来

自5个不同供体的原代人T细胞。然后,将这些T细胞用于各种测定法。对SupT1细胞进行铬释放测定法。这些细胞是CD19阴性。两种CAR T细胞都不响应这种细胞系,证明了CAR19 CAR对CD19阴性细胞没有非特异性杀伤活性[图5(a)]。(b)还对工程化改造为表达CD19的SupT1细胞进行铬释放测定法。这两种CAR在该测定法中以高水平杀伤对该细胞系表现得相等[图5(b)]。接下来,通过在与靶细胞共培养后染色效应细胞表面上的CD107进行脱粒测定法。这里,使用NT T细胞、fmc63 CAR T细胞或CAT19 CAR T细胞作为效应细胞,并且使用SupT1或SupT1.CD19细胞作为靶物。通过流式细胞术检测表面CD107,所述流式细胞术允许差异测量CD4+和CD8+细胞的脱粒。[分别为图5(c)和(d)]。与fmc63 CAR T细胞相比,脱粒在CAT19 CAR T细胞的情况下是增加的。使用氘标记的胸苷酸盐(thymidilate)掺入估算增殖。在这里,将NT、fmc63 CAR T细胞、CAT19 CAR T细胞与工程化改造为表达CD19的SupT1细胞共培养。胸苷掺入。在本实验中,还测试了无关的靶向GD2的CAR。使用CAR19 CAR T细胞有增加的增殖的趋势[图4(e)]。接下来,通过ELISA测量针对SupT1或SupT1.CD19细胞激发后24小时从NT T细胞、fmc63 CAR T细胞、CAT19 CAR T细胞或GD2 CAR T细胞的干扰素- γ 释放。当用CD19+靶物激发时,CAT19 CAR T细胞产生比fmc63 CAR T细胞显著更少的干扰素- γ 。

[0221] 实施例4:CAT19 CAR疗法的体内功效的证明。

[0222] 该体内模型的实验装置的概述呈现于图6(a)中。简言之,NSG(NOD scid gamma, NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)小鼠是充分免疫受损的,使得它们允许人细胞系和原代人T细胞的植入。Raji细胞是从伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)衍生的B细胞系。这些细胞易于在NSG小鼠的骨髓内移植,导致攻击性白血病样综合征。将Raji细胞工程化以表达萤火虫萤光素酶,以允许使用生物发光成像(BLI)的非侵入性跟踪。通过尾静脉注射给小鼠注射 2.5×10^5 个Raji.FLuc细胞。24小时后,通过尾静脉施用 4×10^6 个NT原代人T细胞或用fmc63 CAR转导的T细胞或用CAT19 CAR转导的T细胞。通过BLI顺序测量肿瘤响应。在第4天采集尾静脉血,用于植入和血清细胞因子。在第11天淘汰动物,并且对组织研究CAR T细胞的持久性和肿瘤负荷。图6(b)中显示了第10天不同小鼠分组的BLI成像。在用NT T细胞处理的小鼠的骨盆、脊柱、肋骨、颅骨和脾脏中看到广泛的疾病,而接收CAT19 CAR T细胞或fmc63 CAR T细胞的小鼠中的最小信号是明显的。在图6(c)中以对数标度显示随时间从不同小鼠分组取平均的定量生物发光信号。在接受NT T细胞的小鼠和接受CAR T细胞的小鼠中的信号积累之间看到明显的差异。在接受fmc63 CAR T细胞或CAT19 CAR T细胞的小鼠中没有看到信号积累的差异。最后,处死后,进行每只小鼠的骨髓的流式细胞术分析以直接确定肿瘤负荷。Raji细胞易于与小鼠造血细胞和过继转移的T细胞区分开,因为它们表达人B细胞标志物。在接受fmc63或CAT19 CAR T细胞的小鼠的骨髓中可以检测到最小的Raji细胞。

[0223] 实施例5:体内持续CAR T细胞的表征

[0224] 从上述动物模型,本发明人试图确定是否在这些NSG小鼠的骨髓和脾内植入了两种类型的CAR T细胞。用计数珠对骨髓和脾脏的流式细胞术分析允许测定CAR T细胞的绝对数。图7(a)和(b)中显示了该数据。来自用fmc63 CAR T细胞或CAT19 CAR T细胞处理的动物的小鼠脾脏中的CAR T细胞的绝对数目是相似的。接下来,本发明人进行确定是否这些不同组织中耗竭的T细胞数目存在任何差异。通过在上述样品中共染色PD1表达,可以确定耗竭的T细胞的数目。图7(c)和(d)中显示了该数据。令人惊讶的是,用CAT19 CAR比fmc63 CAR在

两个组织区室中存在更少的耗竭的T细胞。

[0225] 上述说明书中提及的所有出版物通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明的所述方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。虽然已经结合具体的优选实施方案描述了本发明,但是应当理解,所要求保护的本发明不应被不适当地限于这些具体实施方案。实际上,对分子生物学、CAR技术或相关领域的技术人员显而易见的用于实施本发明的描述模式的各种修改意图在所附权利要求书的范围内。

[0001] 序列表
[0002] <110> UCL商务股份有限公司
[0003] <120> 嵌合抗原受体
[0004] <130> P105665PCT
[0005] <150> GB 1503742.7
[0006] <151> 2015-03-05
[0007] <160> 43
[0008] <170> PatentIn version 3.5
[0009] <210> 1
[0010] <211> 7
[0011] <212> PRT
[0012] <213> 人工序列
[0013] <220>
[0014] <223> 重链可变区 (VH) 互补决定区 (CDR) CDR1
[0015] <400> 1
[0016] Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
[0017] 1 5
[0018] <210> 2
[0019] <211> 6
[0020] <212> PRT
[0021] <213> 人工序列
[0022] <220>
[0023] <223> VH CDR, CDR2
[0024] <400> 2
[0025] Tyr Pro Gly Asp Glu Asp
[0026] 1 5
[0027] <210> 3
[0028] <211> 10
[0029] <212> PRT
[0030] <213> 人工序列
[0031] <220>
[0032] <223> VH CDR, CDR3
[0033] <400> 3
[0034] Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr
[0035] 1 5 10
[0036] <210> 4
[0037] <211> 10
[0038] <212> PRT

[0039]	<213>	人工序列
[0040]	<220>	
[0041]	<223>	轻链可变区 (VL) CDR, CDR1
[0042]	<400>	4
[0043]	Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His	
[0044]	1	5 10
[0045]	<210>	5
[0046]	<211>	7
[0047]	<212>	PRT
[0048]	<213>	人工序列
[0049]	<220>	
[0050]	<223>	VL CDR, CDR2
[0051]	<400>	5
[0052]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser	
[0053]	1	5
[0054]	<210>	6
[0055]	<211>	9
[0056]	<212>	PRT
[0057]	<213>	人工序列
[0058]	<220>	
[0059]	<223>	VL CDR, CDR3
[0060]	<400>	6
[0061]	Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr	
[0062]	1	5
[0063]	<210>	7
[0064]	<211>	119
[0065]	<212>	PRT
[0066]	<213>	人工序列
[0067]	<220>	
[0068]	<223>	来自鼠单克隆抗体的VH序列
[0069]	<400>	7
[0070]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[0071]	1	5 10 15
[0072]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser	
[0073]		20 25 30
[0074]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[0075]		35 40 45
[0076]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe	
[0077]		50 55 60

[0078]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
[0079]	65 70 75 80
[0080]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0081]	85 90 95
[0082]	Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0083]	100 105 110
[0084]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[0085]	115
[0086]	<210> 8
[0087]	<211> 107
[0088]	<212> PRT
[0089]	<213> 人工序列
[0090]	<220>
[0091]	<223> 来自鼠单克隆抗体的VL序列
[0092]	<400> 8
[0093]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0094]	1 5 10 15
[0095]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0096]	20 25 30
[0097]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[0098]	35 40 45
[0099]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
[0100]	50 55 60
[0101]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu
[0102]	65 70 75 80
[0103]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr
[0104]	85 90 95
[0105]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
[0106]	100 105
[0107]	<210> 9
[0108]	<211> 241
[0109]	<212> PRT
[0110]	<213> 人工序列
[0111]	<220>
[0112]	<223> 来自鼠单克隆抗体的VH-VL scFv序列
[0113]	<400> 9
[0114]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0115]	1 5 10 15
[0116]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser

[0117]	20	25	30
[0118]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[0119]	35	40	45
[0120]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe		
[0121]	50	55	60
[0122]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr		
[0123]	65	70	75
[0124]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0125]	85	90	95
[0126]	Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0127]	100	105	110
[0128]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
[0129]	115	120	125
[0130]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile		
[0131]	130	135	140
[0132]	Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser		
[0133]	145	150	155
[0134]	Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser		
[0135]	165	170	175
[0136]	Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro		
[0137]	180	185	190
[0138]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile		
[0139]	195	200	205
[0140]	Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp		
[0141]	210	215	220
[0142]	Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[0143]	225	230	235
[0144]	Arg		240
[0145]	<210> 10		
[0146]	<211> 488		
[0147]	<212> PRT		
[0148]	<213> 人工序列		
[0149]	<220>		
[0150]	<223> 使用"Campana"构造的CAT19嵌合抗原受体 (CAR)		
[0151]	<400> 10		
[0152]	Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala		
[0153]	1	5	10
[0154]	Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu		
[0155]	20	25	30

[0156]	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
[0157]			35					40					45			
[0158]	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys
[0159]			50				55					60				
[0160]	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Glu	Asp	Thr	Asn
[0161]	65					70					75					80
[0162]	Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
[0163]					85					90					95	
[0164]	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
[0165]				100					105					110		
[0166]	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Leu	Asp
[0167]				115					120				125			
[0168]	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[0169]			130					135					140			
[0170]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr
[0171]	145						150					155				160
[0172]	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met
[0173]					165						170					175
[0174]	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
[0175]				180							185				190	
[0176]	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu
[0177]				195					200				205			
[0178]	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser
[0179]			210					215					220			
[0180]	Tyr	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr
[0181]	225						230					235				240
[0182]	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ile	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr
[0183]					245					250					255	
[0184]	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg
[0185]				260						265				270		
[0186]	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg
[0187]				275					280					285		
[0188]	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly
[0189]			290						295				300			
[0190]	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr
[0191]	305						310				315					320
[0192]	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg
[0193]					325					330					335	
[0194]	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro

[0195]	340					345					350						
[0196]	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	
[0197]	355					360					365						
[0198]	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	
[0199]	370					375					380						
[0200]	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	
[0201]	385					390					395					400	
[0202]	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	
[0203]	405					410					415						
[0204]	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	
[0205]	420					425					430						
[0206]	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	
[0207]	435					440					445						
[0208]	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	
[0209]	450					455					460						
[0210]	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	
[0211]	465					470					475					480	
[0212]	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg									
[0213]	485																
[0214]	<210> 11																
[0215]	<211> 483																
[0216]	<212> PRT																
[0217]	<213> 人工序列																
[0218]	<220>																
[0219]	<223> 具有OX40-Zeta胞内域的CAT19 CAR																
[0220]	<400> 11																
[0221]	Met	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Cys	Trp	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala	
[0222]	1	5					10					15					
[0223]	Asp	His	Ala	Asp	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	
[0224]	20					25					30						
[0225]	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	
[0226]	35					40					45						
[0227]	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys	
[0228]	50					55					60						
[0229]	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Glu	Asp	Thr	Asn	
[0230]	65					70					75					80	
[0231]	Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	
[0232]	85					90					95						
[0233]	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	

[0234]	100	105	110
[0235]	Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp		
[0236]	115	120	125
[0237]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly		
[0238]	130	135	140
[0239]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr		
[0240]	145	150	155
[0241]	Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met		
[0242]	165	170	175
[0243]	Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln		
[0244]	180	185	190
[0245]	Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu		
[0246]	195	200	205
[0247]	Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser		
[0248]	210	215	220
[0249]	Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr		
[0250]	225	230	235
[0251]	Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr		
[0252]	245	250	255
[0253]	Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg		
[0254]	260	265	270
[0255]	Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
[0256]	275	280	285
[0257]	Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		
[0258]	290	295	300
[0259]	Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
[0260]	305	310	315
[0261]	Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Arg		
[0262]	325	330	335
[0263]	Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser		
[0264]	340	345	350
[0265]	Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu		
[0266]	355	360	365
[0267]	Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
[0268]	370	375	380
[0269]	Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
[0270]	385	390	395
[0271]	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
[0272]	405	410	415

[0273]	Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
[0274]	420 425 430
[0275]	Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
[0276]	435 440 445
[0277]	Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
[0278]	450 455 460
[0279]	Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
[0280]	465 470 475 480
[0281]	Pro Pro Arg
[0282]	<210> 12
[0283]	<211> 487
[0284]	<212> PRT
[0285]	<213> 人工序列
[0286]	<220>
[0287]	<223> 具有CD28-Zeta胞内域的CAT19 CAR
[0288]	<400> 12
[0289]	Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[0290]	1 5 10 15
[0291]	Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
[0292]	20 25 30
[0293]	Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
[0294]	35 40 45
[0295]	Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys
[0296]	50 55 60
[0297]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn
[0298]	65 70 75 80
[0299]	Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
[0300]	85 90 95
[0301]	Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
[0302]	100 105 110
[0303]	Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp
[0304]	115 120 125
[0305]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
[0306]	130 135 140
[0307]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr
[0308]	145 150 155 160
[0309]	Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
[0310]	165 170 175
[0311]	Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln

[0312]	180	185	190
[0313]	Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu		
[0314]	195	200	205
[0315]	Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser		
[0316]	210	215	220
[0317]	Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr		
[0318]	225	230	235
[0319]	Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr		
[0320]	245	250	255
[0321]	Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg		
[0322]	260	265	270
[0323]	Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
[0324]	275	280	285
[0325]	Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		
[0326]	290	295	300
[0327]	Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
[0328]	305	310	315
[0329]	Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser		
[0330]	325	330	335
[0331]	Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg		
[0332]	340	345	350
[0333]	Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg		
[0334]	355	360	365
[0335]	Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		
[0336]	370	375	380
[0337]	Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		
[0338]	385	390	395
[0339]	Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		
[0340]	405	410	415
[0341]	Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		
[0342]	420	425	430
[0343]	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		
[0344]	435	440	445
[0345]	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu		
[0346]	450	455	460
[0347]	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His		
[0348]	465	470	475
[0349]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0350]	485		

[0351]	<210>	13
[0352]	<211>	527
[0353]	<212>	PRT
[0354]	<213>	人工序列
[0355]	<220>	
[0356]	<223>	第三代CD19 CAR
[0357]	<400>	13
[0358]	Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala	
[0359]	1	5 10 15
[0360]	Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu	
[0361]		20 25 30
[0362]	Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr	
[0363]		35 40 45
[0364]	Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys	
[0365]		50 55 60
[0366]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn	
[0367]	65	70 75 80
[0368]	Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser	
[0369]		85 90 95
[0370]	Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser	
[0371]		100 105 110
[0372]	Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp	
[0373]		115 120 125
[0374]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly	
[0375]		130 135 140
[0376]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr	
[0377]	145	150 155 160
[0378]	Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met	
[0379]		165 170 175
[0380]	Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln	
[0381]		180 185 190
[0382]	Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu	
[0383]		195 200 205
[0384]	Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser	
[0385]		210 215 220
[0386]	Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr	
[0387]	225	230 235 240
[0388]	Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr	
[0389]		245 250 255

[0390]	Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
[0391]	260 265 270
[0392]	Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
[0393]	275 280 285
[0394]	Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
[0395]	290 295 300
[0396]	Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
[0397]	305 310 315 320
[0398]	Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
[0399]	325 330 335
[0400]	Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
[0401]	340 345 350
[0402]	Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
[0403]	355 360 365
[0404]	Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu
[0405]	370 375 380
[0406]	Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro
[0407]	385 390 395 400
[0408]	Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg
[0409]	405 410 415
[0410]	Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
[0411]	420 425 430
[0412]	Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
[0413]	435 440 445
[0414]	Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
[0415]	450 455 460
[0416]	Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
[0417]	465 470 475 480
[0418]	Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
[0419]	485 490 495
[0420]	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
[0421]	500 505 510
[0422]	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0423]	515 520 525
[0424]	<210> 14
[0425]	<211> 465
[0426]	<212> PRT
[0427]	<213> 人工序列
[0428]	<220>

[0429]	<223> 具有IgG1铰链间隔物的CD19 CAR															
[0430]	<400> 14															
[0431]	Met	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Cys	Trp	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
[0432]	1				5					10					15	
[0433]	Asp	His	Ala	Asp	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu
[0434]					20					25					30	
[0435]	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
[0436]					35					40					45	
[0437]	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys
[0438]					50					55					60	
[0439]	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Glu	Asp	Thr	Asn
[0440]	65					70					75					80
[0441]	Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
[0442]					85					90					95	
[0443]	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
[0444]					100					105					110	
[0445]	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Leu	Asp
[0446]					115					120					125	
[0447]	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[0448]					130					135					140	
[0449]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr
[0450]	145					150					155					160
[0451]	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met
[0452]					165					170					175	
[0453]	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
[0454]					180					185					190	
[0455]	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu
[0456]					195					200					205	
[0457]	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser
[0458]					210					215					220	
[0459]	Tyr	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr
[0460]	225					230					235					240
[0461]	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ile	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr
[0462]					245					250					255	
[0463]	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp
[0464]					260					265					270	
[0465]	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val
[0466]					275					280					285	
[0467]	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr

[0468]	290	295	300
[0469]	Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu		
[0470]	305	310	315 320
[0471]	His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg		
[0472]	325	330	335
[0473]	Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg		
[0474]	340	345	350
[0475]	Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln		
[0476]	355	360	365
[0477]	Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu		
[0478]	370	375	380
[0479]	Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly		
[0480]	385	390	395 400
[0481]	Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln		
[0482]	405	410	415
[0483]	Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu		
[0484]	420	425	430
[0485]	Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr		
[0486]	435	440	445
[0487]	Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro		
[0488]	450	455	460
[0489]	Arg		
[0490]	465		
[0491]	<210> 15		
[0492]	<211> 681		
[0493]	<212> PRT		
[0494]	<213> 人工序列		
[0495]	<220>		
[0496]	<223> 具有人IgG1的铰链CH2-CH3的CD19 CAR, FcR结合位点突变出来		
[0497]	<400> 15		
[0498]	Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala		
[0499]	1	5	10 15
[0500]	Asp His Ala Asp Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu		
[0501]	20	25	30
[0502]	Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
[0503]	35	40	45
[0504]	Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys		
[0505]	50	55	60
[0506]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Asn		

[0507]	65				70				75				80			
[0508]	Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
[0509]	85				90				95							
[0510]	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
[0511]	100				105				110							
[0512]	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Leu	Asp
[0513]	115				120				125							
[0514]	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[0515]	130				135				140							
[0516]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr
[0517]	145				150				155				160			
[0518]	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met
[0519]	165				170				175							
[0520]	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
[0521]	180				185				190							
[0522]	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu
[0523]	195				200				205							
[0524]	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser
[0525]	210				215				220							
[0526]	Tyr	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr
[0527]	225				230				235				240			
[0528]	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ile	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr
[0529]	245				250				255							
[0530]	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp
[0531]	260				265				270							
[0532]	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro
[0533]	275				280				285							
[0534]	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala
[0535]	290				295				300							
[0536]	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
[0537]	305				310				315				320			
[0538]	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
[0539]	325				330				335							
[0540]	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
[0541]	340				345				350							
[0542]	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
[0543]	355				360				365							
[0544]	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
[0545]	370				375				380							

[0546]	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
[0547]	385					390				395					400	
[0548]	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
[0549]					405					410					415	
[0550]	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
[0551]				420					425					430		
[0552]	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
[0553]			435					440					445			
[0554]	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
[0555]		450					455					460				
[0556]	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
[0557]	465					470					475					480
[0558]	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
[0559]				485					490						495	
[0560]	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu
[0561]				500					505					510		
[0562]	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val
[0563]			515					520					525			
[0564]	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
[0565]		530					535					540				
[0566]	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
[0567]	545					550					555					560
[0568]	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser
[0569]				565					570					575		
[0570]	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu
[0571]			580						585				590			
[0572]	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg
[0573]			595					600					605			
[0574]	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln
[0575]		610					615					620				
[0576]	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr
[0577]	625					630					635					640
[0578]	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp
[0579]				645					650					655		
[0580]	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala
[0581]				660					665				670			
[0582]	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg							
[0583]			675						680							
[0584]	<210>	16														

[0585] <211> 7
[0586] <212> PRT
[0587] <213> 人工序列
[0588] <220>
[0589] <223> VH CDR, CDR1
[0590] <400> 16
[0591] Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
[0592] 1 5
[0593] <210> 17
[0594] <211> 5
[0595] <212> PRT
[0596] <213> 人工序列
[0597] <220>
[0598] <223> VH CDR, CDR2
[0599] <400> 17
[0600] Trp Gly Ser Glu Thr
[0601] 1 5
[0602] <210> 18
[0603] <211> 12
[0604] <212> PRT
[0605] <213> 人工序列
[0606] <220>
[0607] <223> VH CDR, CDR3
[0608] <400> 18
[0609] His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
[0610] 1 5 10
[0611] <210> 19
[0612] <211> 11
[0613] <212> PRT
[0614] <213> 人工序列
[0615] <220>
[0616] <223> VL CDR, CDR1
[0617] <400> 19
[0618] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
[0619] 1 5 10
[0620] <210> 20
[0621] <211> 7
[0622] <212> PRT
[0623] <213> 人工序列

[0624] <220>
 [0625] <223> VL CDR, CDR2
 [0626] <400> 20
 [0627] His Thr Ser Arg Leu His Ser
 [0628] 1 5
 [0629] <210> 21
 [0630] <211> 9
 [0631] <212> PRT
 [0632] <213> 人工序列
 [0633] <220>
 [0634] <223> VL CDR, CDR3
 [0635] <400> 21
 [0636] Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 [0637] 1 5
 [0638] <210> 22
 [0639] <211> 27
 [0640] <212> PRT
 [0641] <213> 人工序列
 [0642] <220>
 [0643] <223> 跨膜域
 [0644] <400> 22
 [0645] Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 [0646] 1 5 10 15
 [0647] Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 [0648] 20 25
 [0649] <210> 23
 [0650] <211> 114
 [0651] <212> PRT
 [0652] <213> 人工序列
 [0653] <220>
 [0654] <223> CD3 zeta胞内域
 [0655] <400> 23
 [0656] Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 [0657] 1 5 10 15
 [0658] Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 [0659] 20 25 30
 [0660] Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 [0661] 35 40 45
 [0662] Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu

[0663]	50	55	60
[0664]	Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly		
[0665]	65	70	75
[0666]	Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser		
[0667]	85	90	95
[0668]	Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro		
[0669]	100	105	110
[0670]	Pro Arg		
[0671]	<210> 24		
[0672]	<211> 42		
[0673]	<212> PRT		
[0674]	<213> 人工序列		
[0675]	<220>		
[0676]	<223> 41BB胞内域		
[0677]	<400> 24		
[0678]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met		
[0679]	1	5	10
[0680]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		
[0681]	20	25	30
[0682]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
[0683]	35	40	
[0684]	<210> 25		
[0685]	<211> 37		
[0686]	<212> PRT		
[0687]	<213> 人工序列		
[0688]	<220>		
[0689]	<223> 0X40胞内域		
[0690]	<400> 25		
[0691]	Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly		
[0692]	1	5	10
[0693]	Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser		
[0694]	20	25	30
[0695]	Thr Leu Ala Lys Ile		
[0696]	35		
[0697]	<210> 26		
[0698]	<211> 37		
[0699]	<212> PRT		
[0700]	<213> 人工序列		
[0701]	<220>		

[0702]	<223>	CD28胞内域
[0703]	<400>	26
[0704]	Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg	
[0705]	1	5 10 15
[0706]	Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg	
[0707]	20	25 30
[0708]	Asp Phe Ala Ala Tyr	
[0709]	35	
[0710]	<210>	27
[0711]	<211>	154
[0712]	<212>	PRT
[0713]	<213>	人工序列
[0714]	<220>	
[0715]	<223>	41BB-Z胞内域融合物
[0716]	<400>	27
[0717]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met	
[0718]	1	5 10 15
[0719]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe	
[0720]	20	25 30
[0721]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg	
[0722]	35	40 45
[0723]	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn	
[0724]	50	55 60
[0725]	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg	
[0726]	65	70 75 80
[0727]	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro	
[0728]	85	90 95
[0729]	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala	
[0730]	100	105 110
[0731]	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His	
[0732]	115	120 125
[0733]	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp	
[0734]	130	135 140
[0735]	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
[0736]	145	150
[0737]	<210>	28
[0738]	<211>	149
[0739]	<212>	PRT
[0740]	<213>	人工序列

[0741]	<220>
[0742]	<223> OX40-Z胞内域融合物
[0743]	<400> 28
[0744]	Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
[0745]	1 5 10 15
[0746]	Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
[0747]	20 25 30
[0748]	Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
[0749]	35 40 45
[0750]	Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
[0751]	50 55 60
[0752]	Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
[0753]	65 70 75 80
[0754]	Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
[0755]	85 90 95
[0756]	Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
[0757]	100 105 110
[0758]	Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
[0759]	115 120 125
[0760]	Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
[0761]	130 135 140
[0762]	Ala Leu Pro Pro Arg
[0763]	145
[0764]	<210> 29
[0765]	<211> 151
[0766]	<212> PRT
[0767]	<213> 人工序列
[0768]	<220>
[0769]	<223> CD28Z胞内域融合物
[0770]	<400> 29
[0771]	Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
[0772]	1 5 10 15
[0773]	Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
[0774]	20 25 30
[0775]	Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
[0776]	35 40 45
[0777]	Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
[0778]	50 55 60
[0779]	Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg

[0780]	65	70	75	80
[0781]	Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly			
[0782]	85	90	95	
[0783]	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu			
[0784]	100	105	110	
[0785]	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
[0786]	115	120	125	
[0787]	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His			
[0788]	130	135	140	
[0789]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0790]	145	150		
[0791]	<210> 30			
[0792]	<211> 187			
[0793]	<212> PRT			
[0794]	<213> 人工序列			
[0795]	<220>			
[0796]	<223> CD280XZ			
[0797]	<400> 30			
[0798]	Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg			
[0799]	1	5	10	15
[0800]	Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg			
[0801]	20	25	30	
[0802]	Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala			
[0803]	35	40	45	
[0804]	His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu			
[0805]	50	55	60	
[0806]	Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser			
[0807]	65	70	75	80
[0808]	Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr			
[0809]	85	90	95	
[0810]	Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys			
[0811]	100	105	110	
[0812]	Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn			
[0813]	115	120	125	
[0814]	Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu			
[0815]	130	135	140	
[0816]	Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly			
[0817]	145	150	155	160
[0818]	His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr			

[0819]		165		170		175
[0820]	Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
[0821]		180		185		
[0822]	<210> 31					
[0823]	<211> 20					
[0824]	<212> PRT					
[0825]	<213> 人工序列					
[0826]	<220>					
[0827]	<223> 信号肽					
[0828]	<400> 31					
[0829]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro					
[0830]	1	5		10		15
[0831]	Gly Ser Thr Gly					
[0832]		20				
[0833]	<210> 32					
[0834]	<211> 234					
[0835]	<212> PRT					
[0836]	<213> 人工序列					
[0837]	<220>					
[0838]	<223> 间隔物(人IgG1的铰链-CH ₂ CH ₃)					
[0839]	<400> 32					
[0840]	Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro					
[0841]	1	5		10		15
[0842]	Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro					
[0843]		20		25		30
[0844]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val					
[0845]		35		40		45
[0846]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val					
[0847]		50		55		60
[0848]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln					
[0849]	65		70		75	80
[0850]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln					
[0851]		85		90		95
[0852]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala					
[0853]		100		105		110
[0854]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro					
[0855]		115		120		125
[0856]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr					
[0857]		130		135		140

[0858]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[0859]	145 150 155 160
[0860]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[0861]	165 170 175
[0862]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[0863]	180 185 190
[0864]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[0865]	195 200 205
[0866]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[0867]	210 215 220
[0868]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
[0869]	225 230
[0870]	<210> 33
[0871]	<211> 46
[0872]	<212> PRT
[0873]	<213> 人工序列
[0874]	<220>
[0875]	<223> 间隔物(人CD8茎)
[0876]	<400> 33
[0877]	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
[0878]	1 5 10 15
[0879]	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
[0880]	20 25 30
[0881]	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
[0882]	35 40 45
[0883]	<210> 34
[0884]	<211> 20
[0885]	<212> PRT
[0886]	<213> 人工序列
[0887]	<220>
[0888]	<223> 间隔物(人IgG1铰链)
[0889]	<400> 34
[0890]	Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[0891]	1 5 10 15
[0892]	Lys Asp Pro Lys
[0893]	20
[0894]	<210> 35
[0895]	<211> 237
[0896]	<212> PRT

[0897]	<213> 人工序列																		
[0898]	<220>																		
[0899]	<223> 间隔物 (IgG1铰链-Fc)																		
[0900]	<400> 35																		
[0901]	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro			
[0902]	1				5					10					15				
[0903]	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys			
[0904]					20				25					30					
[0905]	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val			
[0906]					35				40					45					
[0907]	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr			
[0908]		50						55					60						
[0909]	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu			
[0910]	65						70					75				80			
[0911]	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His			
[0912]					85					90					95				
[0913]	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys			
[0914]					100					105				110					
[0915]	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln			
[0916]					115					120				125					
[0917]	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu			
[0918]		130						135					140						
[0919]	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro			
[0920]	145					150						155				160			
[0921]	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn			
[0922]					165					170					175				
[0923]	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu			
[0924]					180					185				190					
[0925]	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val			
[0926]					195				200					205					
[0927]	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln			
[0928]		210						215					220						
[0929]	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys						
[0930]	225						230					235							
[0931]	<210> 36																		
[0932]	<211> 236																		
[0933]	<212> PRT																		
[0934]	<213> 人工序列																		
[0935]	<220>																		

[0936]	<223> 间隔物 (IgG1铰链 - Fc,修饰为除去Fc受体识别基序)																		
[0937]	<400> 36																		
[0938]	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro			
[0939]	1			5					10						15				
[0940]	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro			
[0941]				20					25						30				
[0942]	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val			
[0943]				35					40					45					
[0944]	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val			
[0945]		50					55					60							
[0946]	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln			
[0947]	65					70					75					80			
[0948]	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln			
[0949]					85					90						95			
[0950]	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala			
[0951]				100					105						110				
[0952]	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro			
[0953]				115					120						125				
[0954]	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr			
[0955]		130						135						140					
[0956]	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser			
[0957]	145					150					155					160			
[0958]	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr			
[0959]					165					170						175			
[0960]	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr			
[0961]				180					185						190				
[0962]	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe			
[0963]				195					200						205				
[0964]	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys			
[0965]		210						215					220						
[0966]	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys							
[0967]	225					230						235							
[0968]	<210> 37																		
[0969]	<211> 244																		
[0970]	<212> PRT																		
[0971]	<213> 人工序列																		
[0972]	<220>																		
[0973]	<223> 单链可变片段(scFv), scFv_fmc63_VH-VL																		
[0974]	<400> 37																		

[0975]	Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
[0976]	1 5 10 15
[0977]	Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
[0978]	20 25 30
[0979]	Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
[0980]	35 40 45
[0981]	Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
[0982]	50 55 60
[0983]	Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
[0984]	65 70 75 80
[0985]	Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
[0986]	85 90 95
[0987]	Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0988]	100 105 110
[0989]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0990]	115 120 125
[0991]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser
[0992]	130 135 140
[0993]	Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala
[0994]	145 150 155 160
[0995]	Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp
[0996]	165 170 175
[0997]	Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
[0998]	180 185 190
[0999]	Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu
[1000]	195 200 205
[1001]	Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
[1002]	210 215 220
[1003]	Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
[1004]	225 230 235 240
[1005]	Ile Thr Lys Ala
[1006]	<210> 38
[1007]	<211> 244
[1008]	<212> PRT
[1009]	<213> 人工序列
[1010]	<220>
[1011]	<223> scFv, scFv_fmc63_VL-VH
[1012]	<400> 38
[1013]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

[1014]	1	5	10	15
[1015]	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr			
[1016]	20	25	30	
[1017]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
[1018]	35	40	45	
[1019]	Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1020]	50	55	60	
[1021]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln			
[1022]	65	70	75	80
[1023]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr			
[1024]	85	90	95	
[1025]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Gly Gly Gly			
[1026]	100	105	110	
[1027]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu			
[1028]	115	120	125	
[1029]	Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val			
[1030]	130	135	140	
[1031]	Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp			
[1032]	145	150	155	160
[1033]	Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp			
[1034]	165	170	175	
[1035]	Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr			
[1036]	180	185	190	
[1037]	Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser			
[1038]	195	200	205	
[1039]	Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr			
[1040]	210	215	220	
[1041]	Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val			
[1042]	225	230	235	240
[1043]	Thr Val Ser Ser			
[1044]	<210> 39			
[1045]	<211> 249			
[1046]	<212> PRT			
[1047]	<213> 人工序列			
[1048]	<220>			
[1049]	<223> scFv, scFv_4g7_VH-VL			
[1050]	<400> 39			
[1051]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala			
[1052]	1	5	10	15

[1053]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[1054]	20 25 30
[1055]	Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[1056]	35 40 45
[1057]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[1058]	50 55 60
[1059]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1060]	65 70 75 80
[1061]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1062]	85 90 95
[1063]	Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
[1064]	100 105 110
[1065]	Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[1066]	115 120 125
[1067]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala
[1068]	130 135 140
[1069]	Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg
[1070]	145 150 155 160
[1071]	Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp
[1072]	165 170 175
[1073]	Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
[1074]	180 185 190
[1075]	Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
[1076]	195 200 205
[1077]	Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
[1078]	210 215 220
[1079]	Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
[1080]	225 230 235 240
[1081]	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
[1082]	245
[1083]	<210> 40
[1084]	<211> 250
[1085]	<212> PRT
[1086]	<213> 人工序列
[1087]	<220>
[1088]	<223> scFv, scFv_4g7_VL-VH
[1089]	<400> 40
[1090]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
[1091]	1 5 10 15

[1092]	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser		
[1093]	20	25	30
[1094]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[1095]	35	40	45
[1096]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro		
[1097]	50	55	60
[1098]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile		
[1099]	65	70	75
[1100]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His		
[1101]	85	90	95
[1102]	Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[1103]	100	105	110
[1104]	Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
[1105]	115	120	125
[1106]	Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly		
[1107]	130	135	140
[1108]	Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser		
[1109]	145	150	155
[1110]	Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp		
[1111]	165	170	175
[1112]	Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys		
[1113]	180	185	190
[1114]	Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala		
[1115]	195	200	205
[1116]	Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr		
[1117]	210	215	220
[1118]	Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp		
[1119]	225	230	235
[1120]	Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
[1121]	245	250	
[1122]	<210> 41		
[1123]	<211> 242		
[1124]	<212> PRT		
[1125]	<213> 人工序列		
[1126]	<220>		
[1127]	<223> scFv, scFv_CAT_VL-VH		
[1128]	<400> 41		
[1129]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly		
[1130]	1	5	10
			15

[1131]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[1132]	20 25 30
[1133]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[1134]	35 40 45
[1135]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
[1136]	50 55 60
[1137]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Phe Leu Thr Ile Asn Asn Met Glu Ala Glu
[1138]	65 70 75 80
[1139]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ile Asn Pro Leu Thr
[1140]	85 90 95
[1141]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Gly Gly Gly Gly
[1142]	100 105 110
[1143]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
[1144]	115 120 125
[1145]	Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser
[1146]	130 135 140
[1147]	Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val
[1148]	145 150 155 160
[1149]	Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro
[1150]	165 170 175
[1151]	Gly Asp Glu Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr
[1152]	180 185 190
[1153]	Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser
[1154]	195 200 205
[1155]	Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Leu
[1156]	210 215 220
[1157]	Tyr Gly Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
[1158]	225 230 235 240
[1159]	Ser Ser
[1160]	<210> 42
[1161]	<211> 494
[1162]	<212> PRT
[1163]	<213> 人工序列
[1164]	<220>
[1165]	<223> Fmc63_CAR
[1166]	<400> 42
[1167]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[1168]	1 5 10 15
[1169]	Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser

[1170]	20	25	30
[1171]	Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp		
[1172]	35	40	45
[1173]	Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val		
[1174]	50	55	60
[1175]	Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser		
[1176]	65	70	75
[1177]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser		
[1178]	85	90	95
[1179]	Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn		
[1180]	100	105	110
[1181]	Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys		
[1182]	115	120	125
[1183]	Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[1184]	130	135	140
[1185]	Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu		
[1186]	145	150	155
[1187]	Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val		
[1188]	165	170	175
[1189]	Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys		
[1190]	180	185	190
[1191]	Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr		
[1192]	195	200	205
[1193]	Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys		
[1194]	210	215	220
[1195]	Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala		
[1196]	225	230	235
[1197]	Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met		
[1198]	245	250	255
[1199]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro Thr		
[1200]	260	265	270
[1201]	Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser		
[1202]	275	280	285
[1203]	Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly		
[1204]	290	295	300
[1205]	Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp		
[1206]	305	310	315
[1207]	Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile		
[1208]	325	330	335

[1209]	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys
[1210]					340				345						350	
[1211]	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys
[1212]				355				360						365		
[1213]	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val
[1214]		370					375					380				
[1215]	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn
[1216]	385					390					395					400
[1217]	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val
[1218]				405					410						415	
[1219]	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg
[1220]				420					425					430		
[1221]	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys
[1222]				435				440						445		
[1223]	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg
[1224]		450					455					460				
[1225]	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys
[1226]	465					470					475					480
[1227]	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg		
[1228]				485					490							
[1229]	<210> 43															
[1230]	<211> 18															
[1231]	<212> PRT															
[1232]	<213> 人工序列															
[1233]	<220>															
[1234]	<223> 接头															
[1235]	<400> 43															
[1236]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
[1237]	1				5					10				15		
[1238]	Gly	Ser														

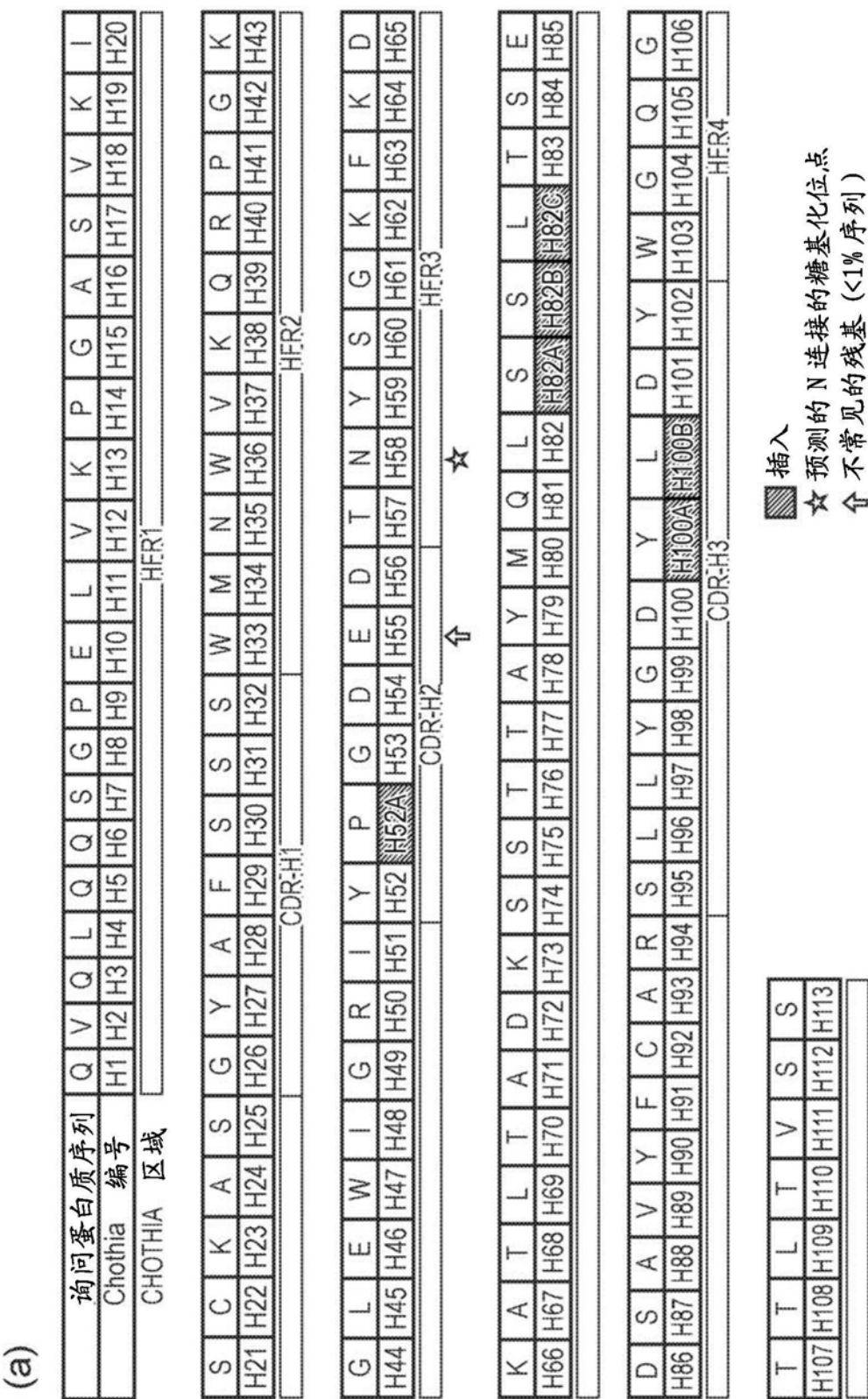


图1

(b)

询问蛋白质序列		Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T
Chothia 编号		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20
CHOTHIA 区域		LFR1																			

M	T	C	S	A	S	S	S	V	S	Y	M	H	W	Y	Q	Q	K	S	G	T	S	P
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43	L44
CDR-L1												LFR2										

K	R	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S
L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66	L67
CDR-L2												LFR3										

G	T	S	Y	F	L	T	I	N	N	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q
L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89	L90
CDR-L3												CDR-L3										

↑

W	N	I	N	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	R
L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107	L108
LFR4												LFR4					

↑

↑ 不常见的残基 (<1%序列)

图1 (续)

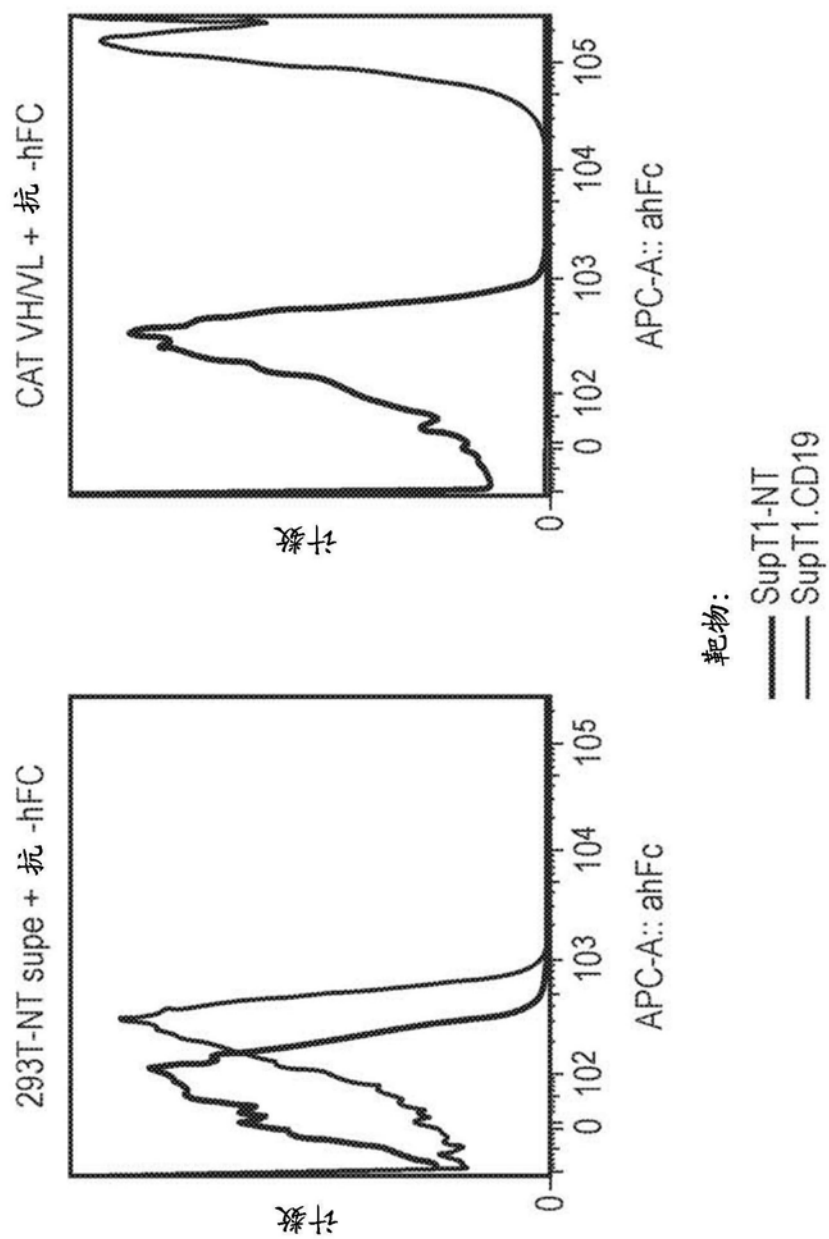


图2

(a)



(b)

SupT1 - aCD19-fmc63

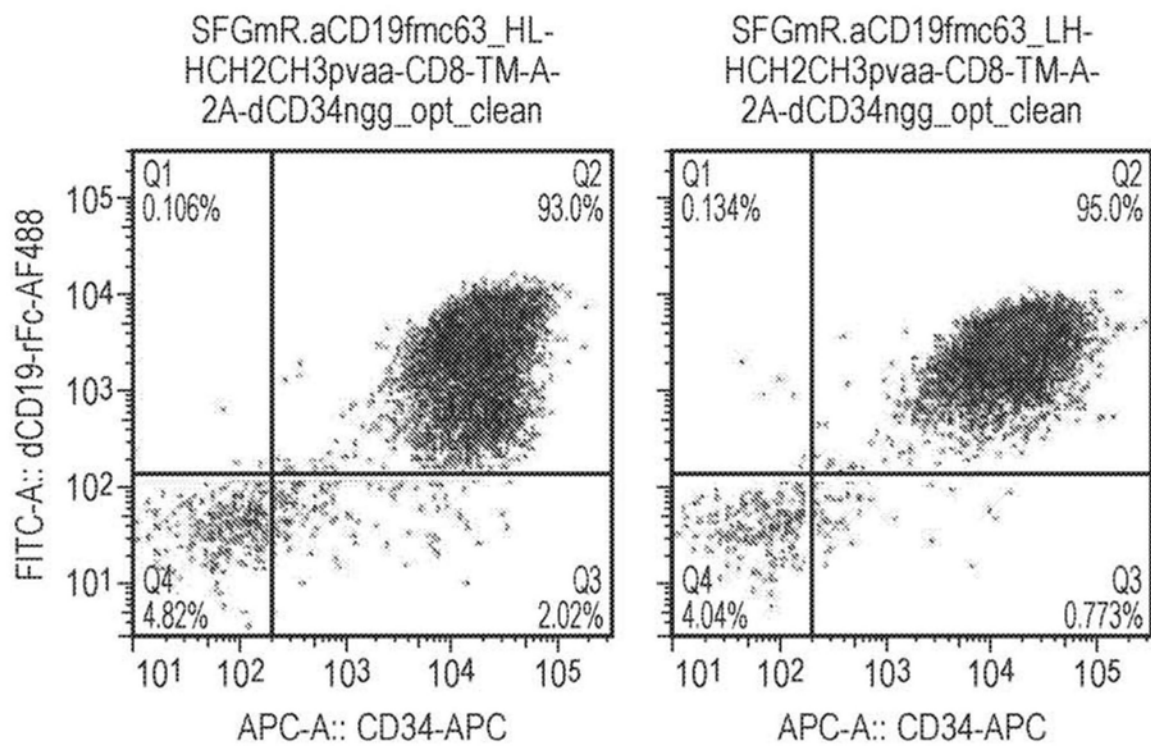


图3

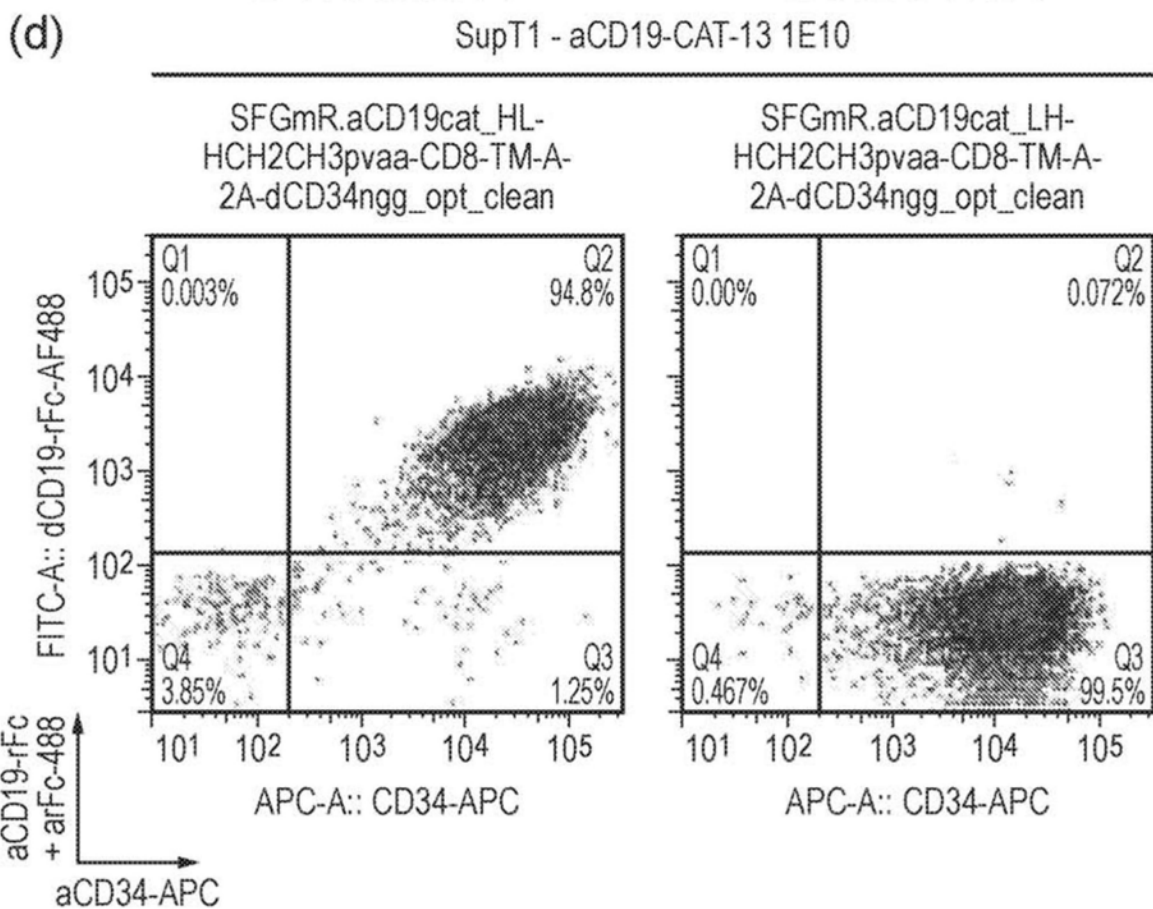
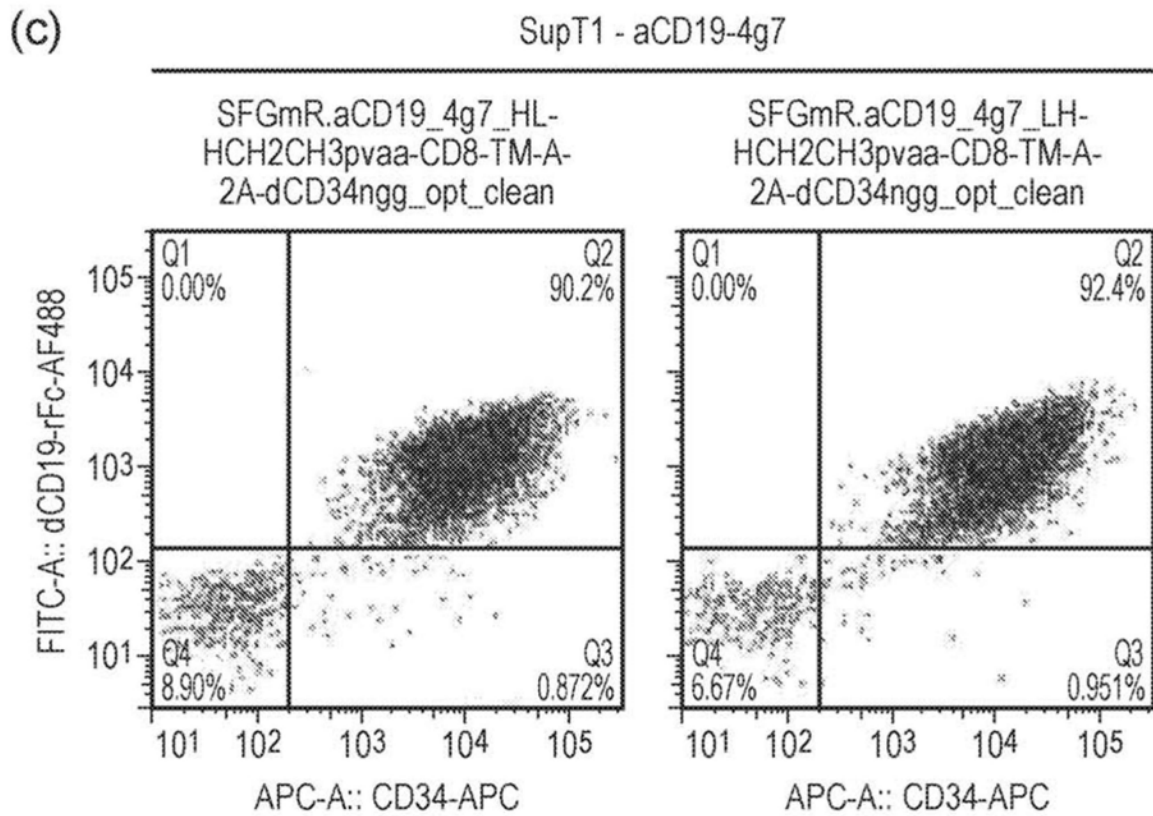


图3(续)

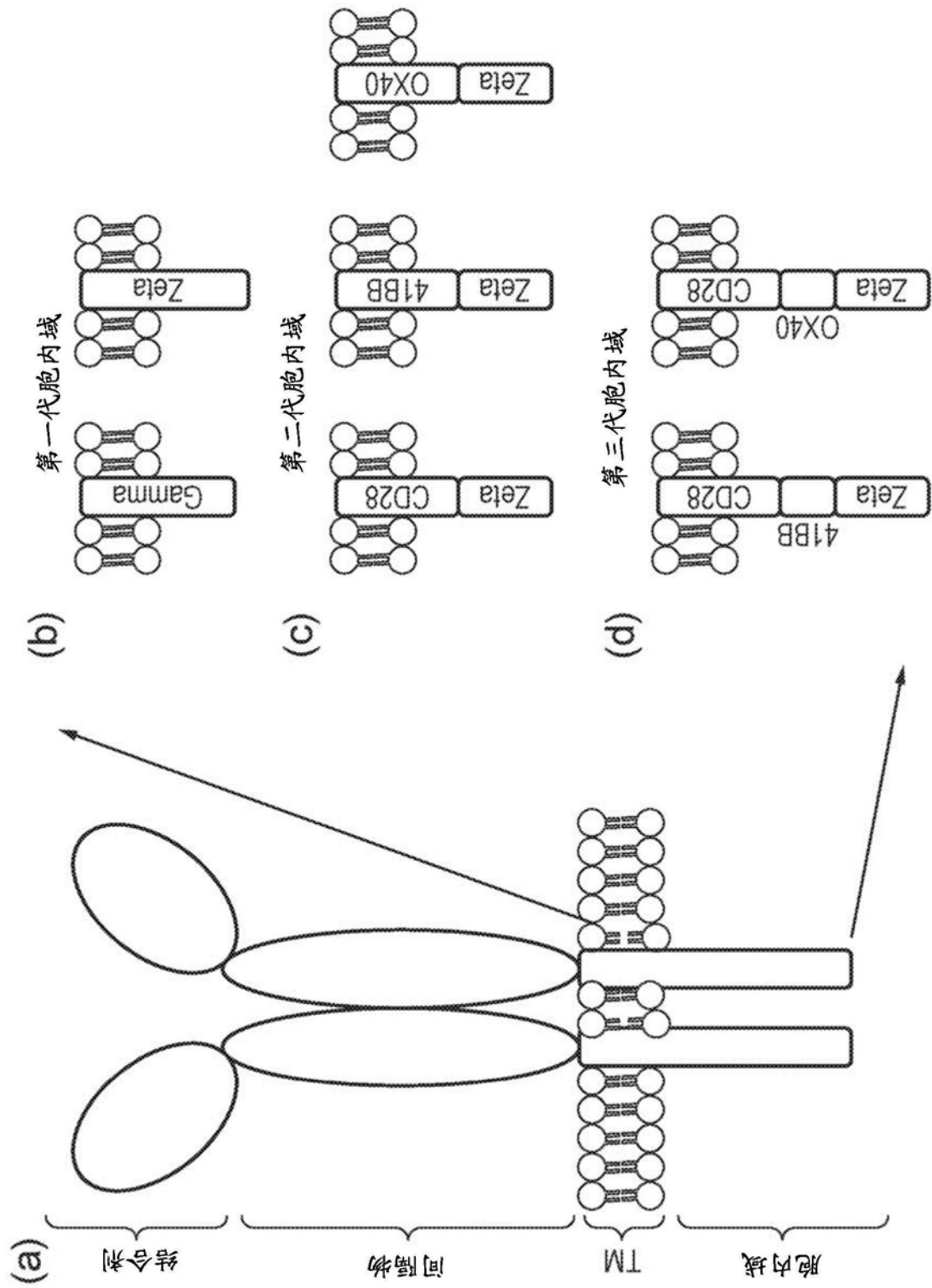


图4

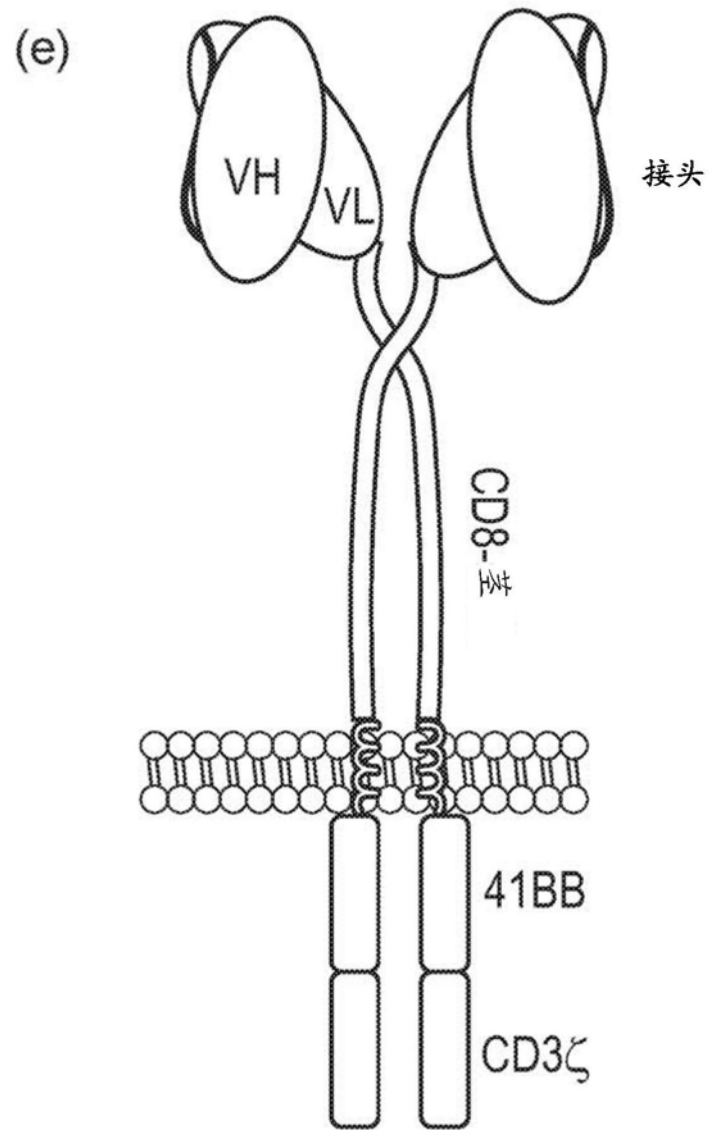


图4(续)

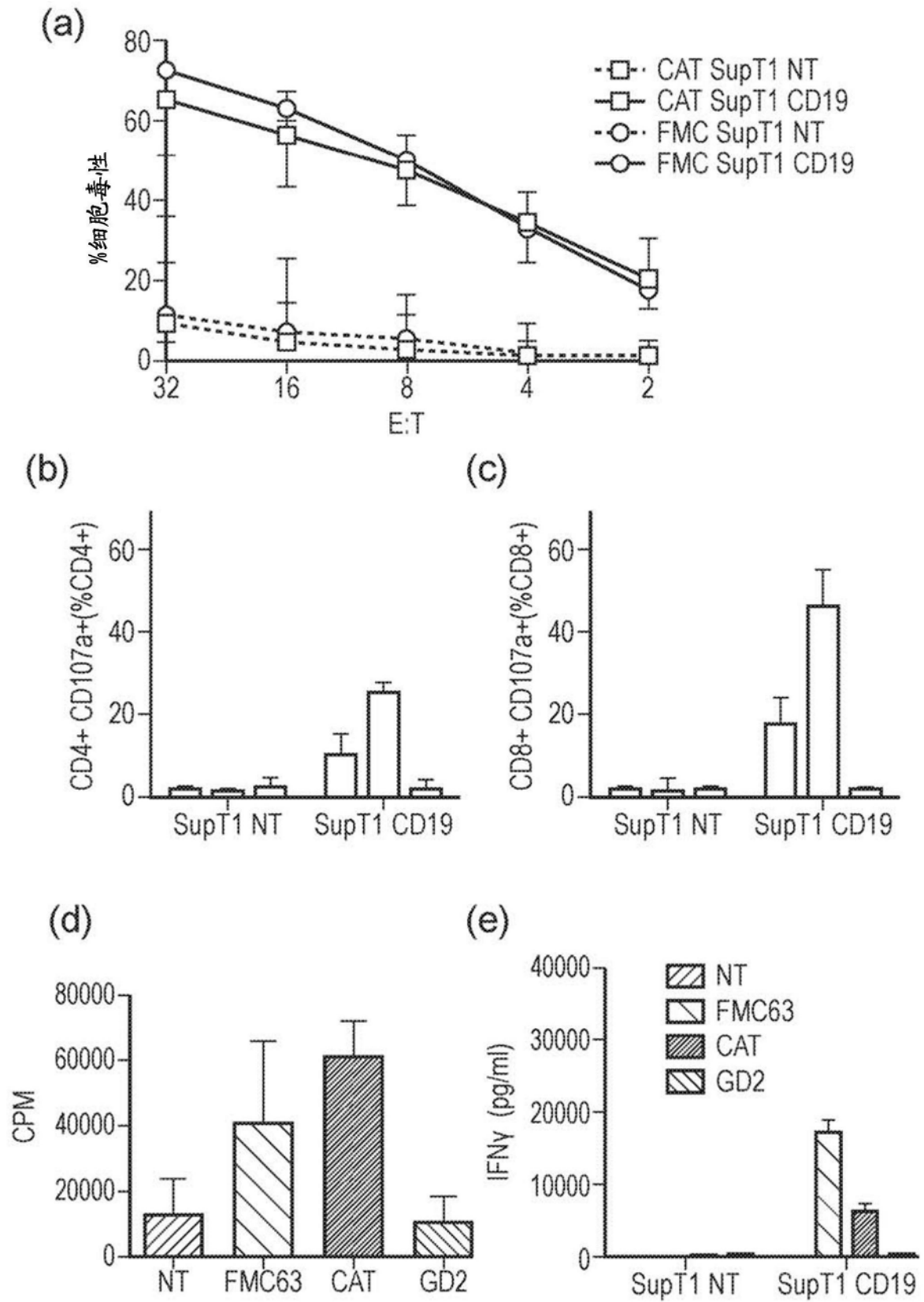


图5

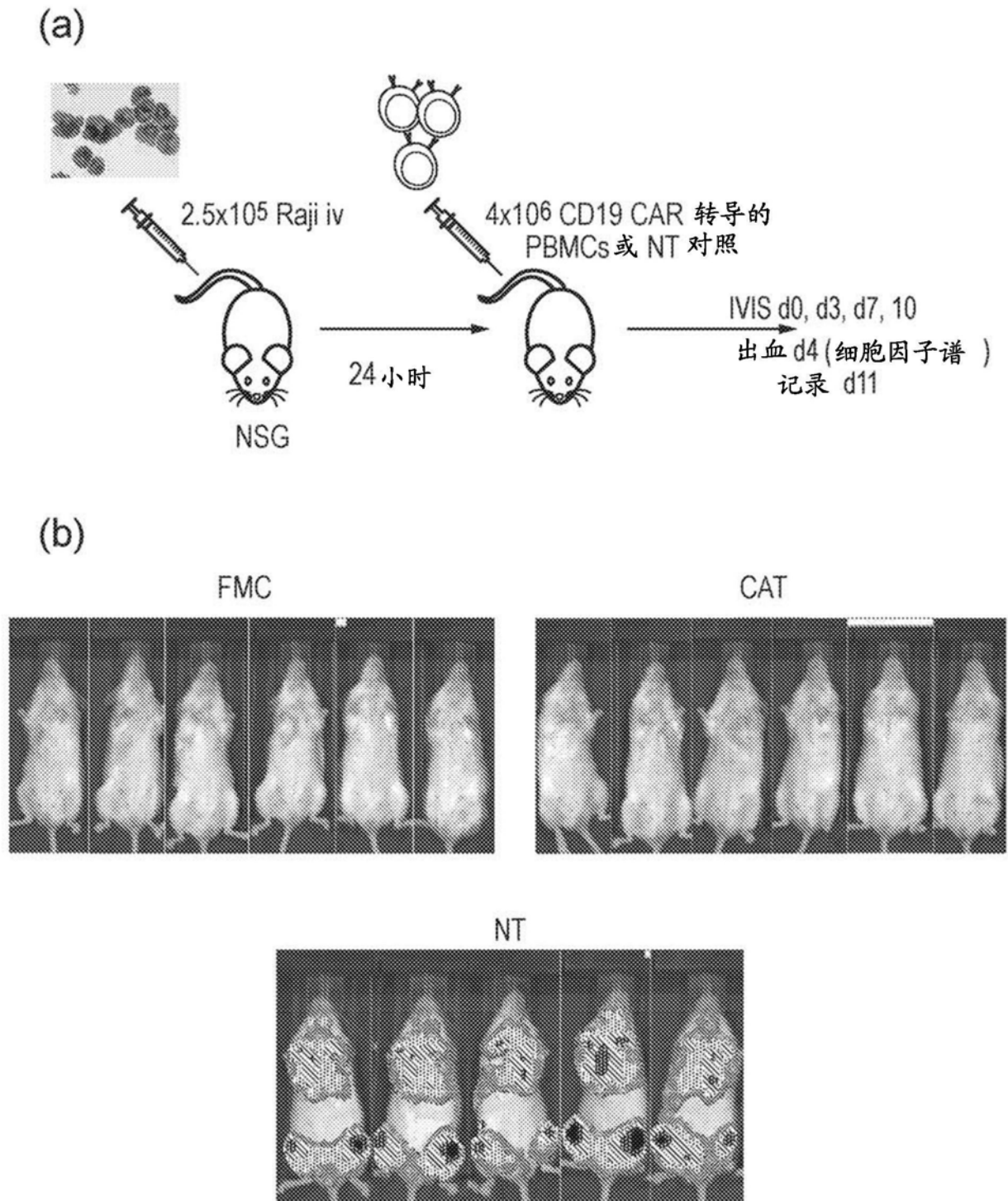
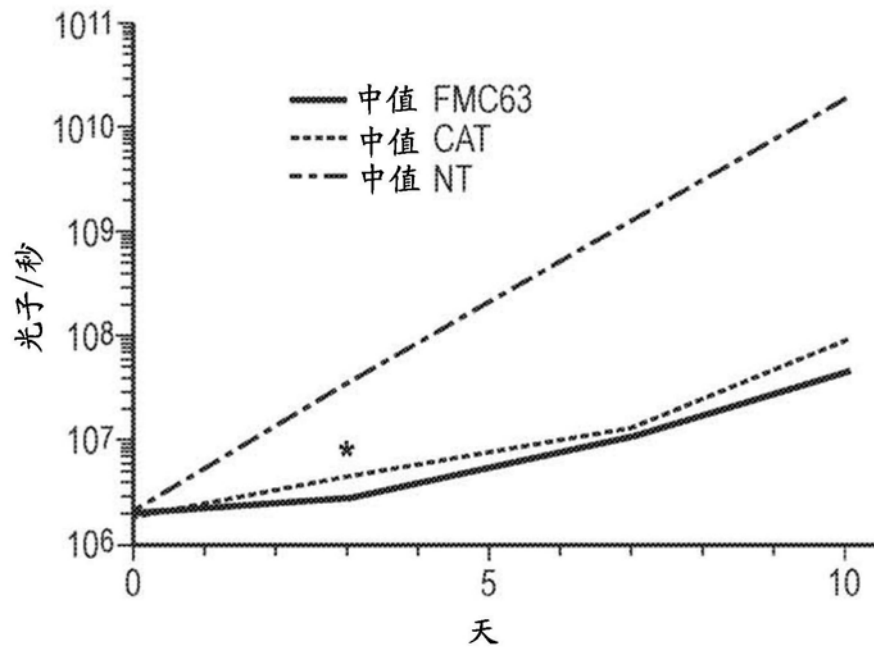


图6

(c)



(d)

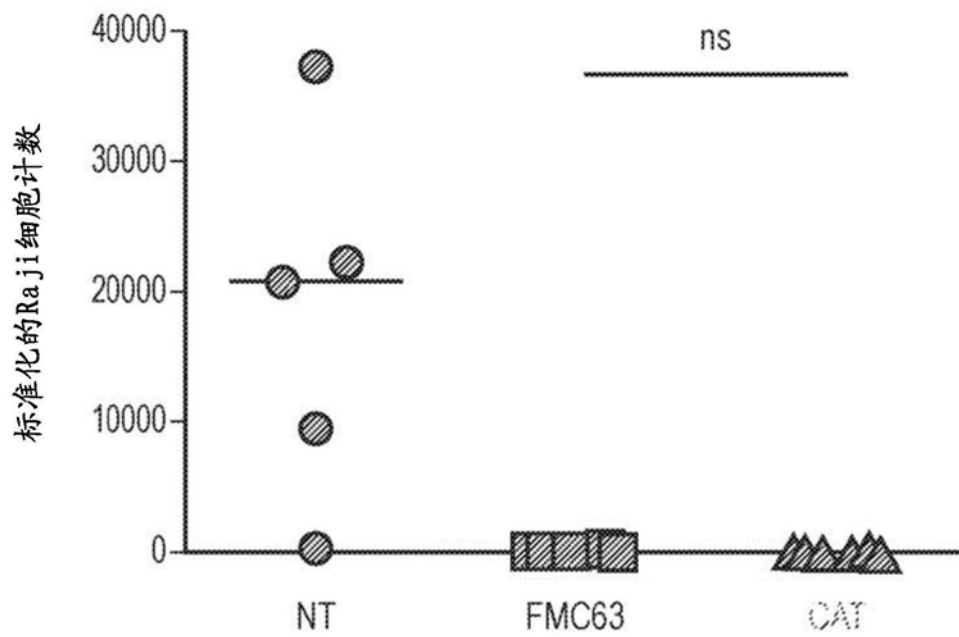


图6(续)

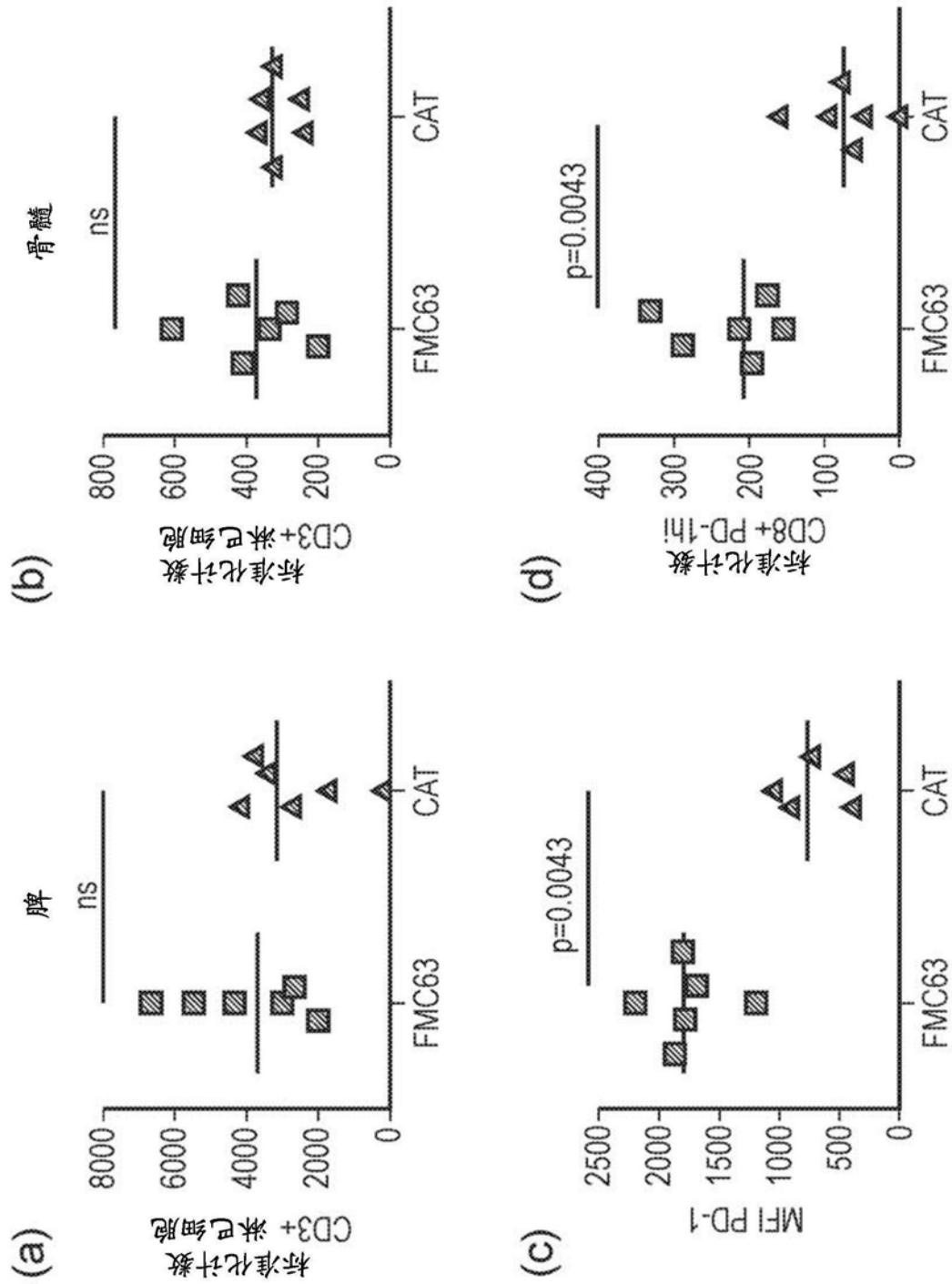


图7