



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116601174 A

(43) 申请公布日 2023.08.15

(21) 申请号 202180083392.0

(22) 申请日 2021.10.11

(30) 优先权数据

63/090,440 2020.10.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/054437 2021.10.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/081486 EN 2022.04.21

(71) 申请人 索伦托药业有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 Q·马 郭文忠 丁蓓蓓 张延良

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 赵昊 张璐

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书2页 说明书36页

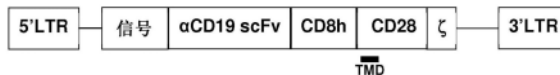
序列表25页 附图16页

(54) 发明名称

CD19定向的嵌合抗原受体构建体

(57) 摘要

本申请公开了编码抗CD19抗体的结构域的CAR构建体、包括并表达CD19CAR构建体的T细胞以及使用方法,如使用表达所述CD19CAR构建体的CAR-T细胞治疗包括血液学癌症的疾病的方法。



1. 一种CD19嵌合抗原受体(CAR)核酸构建体,其包括编码以下各项的核酸序列:
  - i) scFv抗体,所述scFv抗体与CD19结合,其中所述scFv抗体包括重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域,所述VH结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,所述VL结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;
  - ii) 长度为至少65个氨基酸的铰链区;
  - iii) 跨膜结构域;以及
  - iv) 第一胞内结构域和第二胞内结构域,所述第一胞内结构域与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性,所述第二胞内结构域与SEQ ID NO:8具有至少95%同一性,其中与不表达由所述构建体编码的CAR的T细胞对CD19阳性肿瘤细胞表现出的细胞毒性相比,表达由所述构建体编码的所述CAR的T细胞对所述CD19阳性肿瘤细胞表现出更高的细胞毒性。
2. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述scFv抗体包括位于所述重链可变(VH)结构域与所述轻链可变(VL)结构域之间的肽连接子。
3. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述肽连接子包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列。
4. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述scFv抗体包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少95%同一性的氨基酸序列。
5. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述铰链区包括与SEQ ID NO:4具有至少95%同一性的第一氨基酸序列和与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的第二氨基酸序列。
6. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述铰链区包括与SEQ ID NO:13具有至少95%同一性的氨基酸序列。
7. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中跨膜区包括与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的氨基酸序列。
8. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述CAR包括信号肽。
9. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述CAR包括myc标签(SEQ ID NO:15)。
10. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述CAR包括与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。
11. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述CAR包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列。
12. 根据权利要求1所述的CD19 CAR构建体,其中所述CAR包括与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。
13. 一种核酸分子,其包括根据权利要求1至12中任一项所述的CD19 CAR构建体,其中所述CAR构建体与启动子可操作地连接。
14. 一种载体,其包括根据权利要求1至12中任一项所述的CAR构建体。
15. 根据权利要求14所述的载体,其进一步包括启动子,所述启动子与所述CAR构建体可操作地连接。
16. 根据权利要求14所述的载体,其中所述载体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。
17. 根据权利要求16所述的载体,其中所述载体是 $\gamma$ 逆转录病毒载体。
18. 根据权利要求16或17中任一项所述的逆转录病毒载体,其包括启动子,所述启动子

与所述CAR构建体可操作地连接。

19. 一种宿主细胞或宿主细胞群体,其表达根据权利要求1至12中任一项所述的CD19CAR。

20. 根据权利要求19所述的宿主细胞或宿主细胞群体,其选自由以下组成的组:PBMC源性T细胞(或其群体)、胎盘源性T细胞(或其群体)和脐带血源性T细胞(或其群体)。

21. 根据权利要求20所述的宿主细胞或宿主细胞群体,其中所述宿主细胞包括编码CD19CAR的逆转录病毒表达载体或慢病毒表达载体。

22. 根据权利要求20所述的宿主细胞或宿主细胞群体,其中所述宿主细胞包括编码所述CD19 CAR的逆转录病毒表达载体。

23. 根据权利要求19所述的宿主细胞或宿主细胞群体,其中所述宿主细胞是pan T细胞或gd T细胞。

24. 根据权利要求23所述的宿主细胞或宿主细胞群体,其中所述宿主细胞包括编码所述CD19 CAR的逆转录病毒表达载体。

25. 一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求19至24中任一项所述的宿主细胞群体。

26. 一种抑制患者的表达CD19的肿瘤的生长的方法,所述方法包括向所述患者施用T细胞群体,所述T细胞群体包括根据权利要求19至24中任一项的CD19 CAR。

27. 根据权利要求25或26所述的方法,其中所述T细胞群体是从PBMC中分离的。

28. 根据权利要求25或26所述的方法,其中所述T细胞群体是从胎盘组织或脐带血中分离的。

29. 根据权利要求25或26所述的方法,其中所述T细胞群体相对于所述受试者或所述患者是同种异体的。

30. 根据权利要求25至29中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液学癌症。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述癌症是非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)或B急性淋巴细胞白血病(ALL)。

## CD19定向的嵌合抗原受体构建体

[0001] 本申请根据35U.S.C. §119要求于2020年10月12日提交的并且题为“CD19定向的嵌合抗原受体构建体”的美国临时申请第63/090,440号的优先权的权益,所述临时申请的内容通过引用整体并入本文。

[0002] 序列表

[0003] 本申请含有名称为2021-10-11\_01223-0087-00PCT\_Sequence\_Listing\_ST25.txt的序列表,所述序列表于2021年10月11日创建,并且大小为56,997字节。序列表已经以ASCII格式电子提交并且特此通过引用整体并入。

### 技术领域

[0004] 本公开提供了一种针对CD19和表达CD19 CAR的T细胞群体的CAR(嵌合抗原受体)构建体。T细胞表现出对表达CD19的肿瘤细胞的细胞毒性,并且可以用于治疗疾病,如癌症。

### 背景技术

[0005] 嵌合抗原受体(CAR)是合成受体,其中靶向部分与单个融合分子中的一个或多个信号传导结构域相关。具有新型特异性的T细胞已经通过编码CAR的构建体的基因转移而产生,所述CAR可以与所关注靶标特异性结合。CAR已被成功地用于工程化T细胞,使其针对来自各种恶性肿瘤(包含淋巴瘤和实体瘤)的肿瘤细胞的表面处表达的抗原。

[0006] 通常,CAR的胞外靶向部分由单链抗体(scFv)的抗原结合结构域组成,包括通过柔性连接子接合的单克隆抗体的轻和重可变片段。第一代CAR的胞内信号传导结构域来自CD3 $\zeta$ 或Fc受体 $\gamma$ 链的胞质区。第一代CAR已被证明成功地重定向了T细胞的细胞毒性,然而,它们未能在体内提供延长的扩增和抗肿瘤活性。来自包含CD28、OX-40(CD134)和4-1BB(CD137)的共刺激分子的信号传导结构域已被单独(第二代CAR)或组合(第三代CAR)添加,以增强CAR修饰的T细胞的存活率和增加所述细胞的增殖。

[0007] T细胞具有处理正常或恶性细胞的能力,如在病毒性和自身免疫性疾病中以及在罕见的癌症自发缓解中所见。然而,T细胞很容易对自身或肿瘤抗原产生耐受性,并且“免疫监视”未能阻止临床上明显的每种癌症的肿瘤进展。CAR-T研究的目的是通过提供抗体定义的抗恶性细胞标志物识别根据恶性细胞对CAR所识别的抗原的表达杀死所述恶性细胞,来为患者的T细胞提供特异性和亲和力,而不考虑其“内源性”T细胞受体(TCR)库。

[0008] 已经探索了通过输注T细胞工程化的CAR用于重定向杀肿瘤活性的过继性免疫疗法来治疗转移性癌症。CAR是通过将抗体的抗原识别结构域与T细胞的受体的信号传导结构域接合而构建的。用CAR基因修饰T细胞使T细胞具有重新靶向的抗体型抗肿瘤细胞毒性。因为杀伤不受主要组织相容性复合物(MHC)限制,所述方法为所有携带相同抗原的患者提供了一种通用疗法。用抗原特异性CAR工程化的T细胞被称为“CAR-T细胞”或“T体”(Eshar等人,1993《美国国家科学院院刊(Proc.Nat'l.Acad.of.Sci.USA)》90(2):720-724)。第一代CAR,免疫球蛋白-T细胞受体(IgTCR),被工程化为含有仅传递激活刺激(信号1)的信号传导结构域(TCR-CD3 $\zeta$ )(Gross等人,1989《美国国家科学院院刊》86(24):10024-10028;Eshar等

人,1993《美国国家科学院院刊》90(2):720-724;Haynes等人,2001《免疫学杂志(J Immunol.)》166(1):182-187)。由于次优激活,被工程化为仅表达第一代CAR的T细胞表现出有限的抗肿瘤功效。第2代CAR,免疫球蛋白D28-CD3 $\zeta$ -T细胞受体(IgCD28TCR),将共刺激CD28(信号2)整合到第一代受体中,增加了CAR-T细胞的抗肿瘤能力(Finney等人,1998《免疫学杂志》161(6):2791-2797;Hombach等人,2001《免疫学杂志》167(11):6123-6131;Maher等人,2002《自然生物技术(Nat Biotechnol.)》20(1):70-7;Emtage等人,2008《临床癌症研究(Clin Cancer Res.)》14(24):8112-812;Lo等人,2010《临床癌症研究》16(10):2769-2780)。

[0009] 目前使用过继性免疫疗法治疗患者的方案基于自体细胞转移。在这种方法中,从患者体内回收T淋巴细胞,对其进行基因修饰或体外选择,在体外培养,以便在必要时扩增细胞数量,并且最后将其输注到患者体内。除了淋巴细胞输注之外,宿主(患者)可以以支持T细胞移植或其参与免疫应答的其它方式进行操纵,例如预处理(用放射或化学疗法)和施用淋巴细胞生长因子(如IL-2)。每个患者接受单独制造的治疗,使用患者自己的淋巴细胞(即,自体疗法)。

[0010] 可替代地,可以使用同种异体策略,将来自供体的T细胞输注到患者体内。可以预先用CAR构建体转染来自健康供体的同种异体T细胞,用于治疗癌症,并且避免昂贵且耗时的制备和测试每个个体患者的T细胞。为了避免供体细胞与患者之间的不相容性,供体可以是与患者HLA匹配的,或者表达CAR构建体的同种异体T细胞可以被进一步基因改变以消除内源性T细胞受体的表达。

[0011] CD19是免疫球蛋白超家族的95kD的II型跨膜糖蛋白,具有由B细胞谱系的细胞表达的长的C端胞质结构域。在个体发育期间,CD19出现在B谱系定向干细胞上,并且其表达随着B细胞成熟而增加,其中成熟B细胞表达的表面密度为未成熟B细胞的大约三倍。CD19也在恶性B细胞上表达,并且已被用作来源于B细胞谱系的抗肿瘤疗法的靶标,包含例如非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。

## 发明内容

[0012] 本公开提供了一种编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸分子,所述嵌合抗原受体包括能够靶向表达CD19的肿瘤细胞的抗CD19抗体。更具体地,本公开提供了一种CD19 CAR核酸构建体,其中编码的CAR包括与CD19特异性结合的单链抗体(scFv),其中所述scFv抗体具有轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域,所述VL结构域具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列,所述VH结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列。编码的CD19 CAR进一步包含跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,并且优选地进一步包含位于抗原结合蛋白与跨膜结构域之间的铰链区。在各个实施例中,铰链区是长铰链区,例如长度大于约65个氨基酸的铰链区(例如,长度为至少70个、至少75个、至少80个或至少85个氨基酸),并且可以源自两种或更多种多肽的铰链区。在一些实施例中,铰链区包括与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0013] 因此,由如本文所提供的核酸分子编码的CD19 CAR包含源自与CD19特异性结合的抗体的单链抗体,其中所述轻链可变(VL)结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至

少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且所述重链可变(VH)结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且进一步包含跨膜结构域和至少一个胞内结构域。在一些实施例中,CAR的抗CD19单链抗体可以包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或者可以包括与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在替代性实施例中,CAR的抗CD19单链抗体可以包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列,或者可以包括与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0014] 如由本文所提供的核酸构建体编码的CD19 CAR包含至少一个胞内信号传导结构域,优选地包括两个胞内信号传导结构域。在CD19 CAR包含第一胞内信号传导结构域和第二胞内信号传导结构域的实施例中,第一信号传导结构域可以是CD28胞内信号传导结构域、OX-40 (CD134) 信号传导结构域和4-1BB (CD137) 信号传导结构域中的任一种。第二信号传导结构域可以是例如CD3- $\zeta$ 信号传导结构域。在一些优选的实施例中,第一信号传导结构域是具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:7至少95%同一性的氨基酸序列的CD28信号传导结构域。在一些优选的实施例中,第二信号传导结构域是CD3- $\zeta$ 信号传导结构域 (SEQ ID NO:8) 或由其衍生的具有与SEQ ID NO:8至少95%同一性的氨基酸序列的信号传导结构域。

[0015] 作为非限制性实例,CD19 CAR可以包含源自跨膜多肽如CD4、CD8、CD16、CD28、CD80、CD86、CD134、CD137、IgG1或IgG4的跨膜结构域。在一些实施例中,由本文所提供的核酸分子编码的CD19 CAR具有源自CD28的跨膜结构域,并且可以是与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的跨膜结构域。在各个实例中,由本文所提供的核酸构建体编码的CD19 CAR包含定位于scFv与跨膜结构域之间的CD8铰链区,例如CD8 $\alpha$ 铰链区和/或CD28铰链区。铰链区可以包含,例如,与SEQ ID NO:4具有至少95%同一性的氨基酸序列和与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的氨基酸序列,例如,具有源自CD8和CD28两者的序列的铰链区,例如,其中所述铰链区包含与SEQ ID NO:13具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0016] 优选地,核酸构建体进一步包含编码CAR的N端处的信号肽的核酸序列,当合成的CAR定位于细胞膜时,所述信号肽可以被去除。例如,可以使用SEQ ID NO:9的信号肽,或与其具有至少95%同一性的信号肽,或者可以使用另一种信号肽。

[0017] 在一些实施例中,构建体可以任选地包含编码用于检测合成的CAR的肽标签例如myc标签 (SEQ ID NO:10) 或另一种肽标签的序列。在一些实施例中,肽标签定位于成熟CD19CAR的N端,例如由本文所提供的构建体编码的前体CAR的信号肽与scFv之间。

[0018] 由如本文所提供的核酸分子编码的CD19 CAR在一些实施例中可以是SEQ ID NO:14的CAR或与SEQ ID NO:14的CAR具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的CAR。例如,核酸分子可以包含SEQ ID NO:15的核酸序列或与其具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性的核酸序列,其中所述核酸序列编码与SEQ ID NO:14具有至少95%同一性的CD19 CAR。在替代性实施例中,由本文所提供的核酸分子编码的CD19 CAR可以是SEQ ID NO:24的CAR或与SEQ ID NO:24的CAR具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的CAR。例如,核酸分子可以包含SEQ ID NO:25的核酸序列或与其具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性的核酸序列,其中

所述核酸序列编码与SEQ ID NO:24具有至少95%同一性的CD19 CAR。

[0019] 作为非限制性实例,包括编码如本文所公开的CD19 CAR的序列的核酸分子可以是DNA分子或RNA分子,并且可以任选地包含一个或多个经修饰的核苷酸和/或一个或多个骨架修饰。核酸分子可以是线性核酸分子或可以是环状核酸分子,并且可以是双链或单链的。如本文所提供的核酸分子可以是包含CAR编码序列的载体。核酸分子可以是病毒载体或病毒基因组(环状或线性形式)。在一些实施例中,载体可以是包含慢病毒或逆转录病毒包装序列的慢病毒或逆转录病毒转移载体,例如复制缺陷型慢病毒或逆转录病毒(例如, $\gamma$ 逆转录病毒)转移载体。本文进一步包括包含CD19 CAR编码核酸序列的慢病毒或逆转录病毒。在一些实施例中,逆转录病毒是 $\gamma$ 逆转录病毒。如本文所提供的核酸分子的CAR编码序列可以与表达控制序列,如但不限于启动子可操作地连接。与CD19 CAR编码序列可操作地连接的启动子优选地是在人类细胞中有活性的启动子,并且在一些实施例中可以是逆转录病毒启动子,例如逆转录病毒的LTR启动子。

[0020] 在各个实施例中,本文提供了一种 $\gamma$ 逆转录病毒载体,其包括编码CD19 CAR如SEQ ID NO:14的CD19 CAR或与SEQ ID NO:14的CAR具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的CAR的核酸序列的。在一些示例性实施例中, $\gamma$ 逆转录病毒载体包含编码SEQ ID NO:14的CD19 CAR的序列,并且具有SEQ ID NO:16的序列,或者具有与SEQ ID NO:16具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列。

[0021] 在另外的实施例中,本文提供了一种 $\gamma$ 逆转录病毒载体,其包括编码CD19 CAR如SEQ ID NO:24的CD19 CAR或与SEQ ID NO:24的CAR具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列的核酸序列的。在一些示例性实施例中, $\gamma$ 逆转录病毒载体编码SEQ ID NO:24的CD19 CAR,并且具有SEQ ID NO:26的序列,或者具有与SEQ ID NO:26具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列。

[0022] 在另外的方面,本文提供了一种CD19嵌合抗原受体(CAR),其包括:抗CD19 scFv,其中scFv抗体具有 $V_L$ 结构域和 $V_H$ 结构域,所述 $V_L$ 结构域具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列,所述 $V_H$ 结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列。所述CD19 CAR进一步包含跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,并且进一步包含抗原结合蛋白与跨膜结构域之间的铰链区,例如包括与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列的长铰链区。作为非限制性实例,跨膜结构域可以是CD4、CD8、CD16、CD28、CD80、CD86、CD134、CD137、IgG1或IgG4多肽的跨膜结构域,或者与其任一种具有至少95%同一性的跨膜结构域。所述CAR优选地包含两个胞内信号传导结构域,其可以是例如CD28信号传导结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施例中,所述CD19CAR包括与SEQ ID NO:27的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述CD19 CAR包括与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。所述CD19 CAR可以是分离的多肽。所述CD19 CAR可以是插入到转基因细胞(如本文所公开的工程化宿主细胞)的膜中的多肽。

[0023] 本公开进一步提供了一种宿主细胞或宿主细胞群体,其包含CD19 CAR构建体,例如本文所提供的任何构建体。在各个实施例中,所述CD19 CAR可以包括:(i) scFv,所述scFv与CD19结合,其中所述scFv包括轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域,所述VL结构

域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%同一性的氨基酸序列,所述VH结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%同一性的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;以及(iii)至少一个胞内信号传导结构域。在各个实施例中,所述宿主细胞包括如本文所公开的CD19 CAR构建体,所述构建体包含(i) scFv,所述scFv与CD19结合,其中所述scFv包括轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域,所述VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%同一性的氨基酸序列,所述VH结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%同一性的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;以及(iii)两个胞内信号传导结构域,其中第一胞内信号传导结构域是CD28、OX-40或4-1BB胞内信号传导结构域,并且第二胞内信号传导结构域是CD3- $\zeta$ 信号传导结构域。在各个实施例中,所述CAR进一步包含位于抗CD19 scFv与跨膜结构域之间的铰链区,在一些实施例中,所述铰链区可以是长度大于约65个氨基酸的长铰链区,并且可以包括源自CD8铰链序列的序列和源自CD28铰链序列的序列。例如,所述宿主细胞或宿主细胞群体可以包含编码CD19 CAR的非天然核酸序列,所述非天然核酸序列包含与SEQ ID NO:12具有至少95%同一性或与SEQ ID NO:22具有至少95%同一性的抗CD19 scFv,并且可以进一步包含与SEQ ID NO:13具有至少95%同一性的铰链区;与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的跨膜结构域;与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的第一信号传导结构域;以及具有与SEQ ID NO:8至少95%相同的氨基酸序列的第二信号传导结构域。优选地,CAR构建体在CAR编码序列的N端处进一步包含信号肽编码序列,例如编码SEQ ID NO:9或与其具有至少95%同一性的信号肽的序列。所述构建体可以任选地还包含编码用于检测合成的CAR的肽标签如例如myc标签(SEQ ID NO:10)或另一种肽标签的序列。

[0024] 如本文所提供的,被工程化为表达包含编码CD19 CAR的序列的核酸分子的细胞可以与CD19特异性结合。编码CD19 CAR的示例性核酸序列包含SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:15。

[0025] 所述宿主细胞或宿主细胞群体可以是例如T细胞,并且可以是pan T细胞,其可以是PBMC源性T细胞、胎盘源性T细胞或脐带血源性T细胞,或者所述T细胞可以从PBMC、胎盘或脐带血中分离的T细胞亚群。在各个实施例中,所述宿主细胞是用具有编码如本文所提供的CD19 CAR的核酸序列的慢病毒或逆转录病毒(例如, $\gamma$ 逆转录病毒)转导的细胞。编码CD19嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列与启动子可操作地连接,所述启动子引导CD19 CAR构建体在经转导的宿主细胞或宿主细胞群体中的表达。在一些实施例中,启动子可以是逆转录病毒启动子,例如,逆转录病毒载体的LTR的启动子。

[0026] 在一些实例中,宿主细胞或宿主细胞群体包含编码SEQ ID NO:14的核酸序列或与SEQ ID NO:14具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实例中,宿主细胞或宿主细胞群体包含SEQ ID NO:15的核酸序列或与SEQ ID NO:15具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0027] 在一些实例中,宿主细胞或宿主细胞群体包含编码SEQ ID NO:24的核酸序列或与SEQ ID NO:24具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实例中,宿主细胞或宿主细胞群体包含SEQ ID NO:25的核酸序列或与SEQ ID NO:25具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0028] 编码CAR的核酸序列可以插入到细胞的基因组中。在一些实例中,宿主细胞,例如T细胞,通过逆转录病毒进行转导,所述逆转录病毒被工程化为包含编码如本文所公开的CD19 CAR的基因,优选地与启动子可操作地连接,所述启动子可以是逆转录病毒启动子(例如,逆转录病毒LTR的启动子),并且经转导的宿主细胞包含逆转录病毒介导的编码CD19 CAR的核酸序列的插入。经转导的宿主细胞还可以包含与CAR构建体相关的另外的逆转录病毒序列,如例如逆转录病毒(例如, $\gamma$ 逆转录病毒)包装信号的至少一部分。

[0029] 本文所提供的宿主细胞或宿主细胞群体表达CD19嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中宿主细胞或宿主细胞群体上的表达的CD19 CAR与CD19特异性结合。表达CD19嵌合抗原受体(CAR)构建体的T细胞或T细胞群体优先杀死表达CD19的细胞(例如,靶细胞)(对其具有细胞毒性)。

[0030] 本公开提供了一种宿主细胞或宿主细胞群体,其表达CD19 CAR,所述CD19 CAR包含轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域,所述VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,所述VH结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;铰链区、跨膜结构域;以及至少一个胞内结构域。所述宿主细胞或宿主细胞群体可以表达CD19 CAR,如本文所公开的任一种,例如,这样的CD19 CAR:包含与SEQ ID NO:12具有至少95%同一性的CD19 scFv,并且进一步包含与SEQ ID NO:4具有至少95%同一性的铰链区和与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的氨基酸序列;与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的跨膜结构域;与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的第一信号传导结构域;以及具有与SEQ ID NO:8至少95%同一性的氨基酸序列的第二信号传导结构域。所述CAR可以任选地还包含用于检测合成的CAR的肽标签如例如myc标签(SEQ ID NO:10)或另一种肽标签。在一些实施例中,肽标签可以是CAR的scFv的N端。

[0031] 包含如本文所提供的CD19 CAR构建体的宿主细胞或宿主细胞群体可以具有一个或多个编码被破坏的T细胞受体(TCR)亚单位的基因。例如,一个或多个TCR $\alpha$ 或TCR $\beta$ 基因可以被突变,从而不产生功能性亚基。TCR亚基基因可以例如用CRISPR/Cas方法、Talens或锌指核酸酶来破坏。

[0032] 在一些实施例中,表达CD19 CAR的宿主细胞或宿主细胞群体可以是T细胞(或其群体),所述T细胞(或其群体)可以是例如外周血源性T细胞(或其群体)、胎盘源性T细胞(或其群体)或脐带血源性T细胞(或其群体)。

[0033] 本公开进一步提供了一种用于治疗需要治疗的受试者的癌症或抑制需要治疗的受试者的肿瘤生长的方法,所述方法包括:向所述受试者施用表达如本文所提供的CD19 CAR的T细胞群体。施用于受试者的T细胞是本文所描述的宿主细胞,所述宿主细胞包含编码如本文所提供的CD19 CAR的核酸分子。T细胞可以是例如外周血源性T细胞,或者可以是胎盘和/或脐带血源性T细胞。

[0034] 因此,本公开提供了一种用于治疗需要治疗的受试者的癌症或抑制需要治疗的受试者的肿瘤生长的方法,所述方法包括:向所述受试者施用表达如本文所公开的CD19 CAR的T细胞群体,其中所述CAR包含轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域,所述VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,所述VH结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列;铰链区域;跨膜结构域;以及包括两个胞内结构域的胞内区。所述宿主细胞或宿主细胞群体可以包含编码如本

文所公开的任一个CD19 CAR的核酸序列,并且可以表达例如这样的CD19CAR:包含与SEQ ID NO:12具有至少95%同一性的抗CD19 scFv,并且进一步包含与SEQ ID NO:13具有至少95%同一性的铰链区;与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的跨膜结构域;与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的第一信号传导结构域;以及具有与SEQ ID NO:8至少95%同一性的氨基酸序列的第二信号传导结构域。由T细胞表达的CAR可以任选地包含用于检测表达的CAR的肽标签,如例如myc标签(SEQ ID NO:10)或另一种肽标签。

[0035] 本公开提供了用于通过向受试者施用表达任何所提供的CD19 CAR的基因工程化细胞来进行过继性细胞疗法的方法。本文提供的方法包含,例如,向人类受试者施用表达本文所描述的CD19 CAR的宿主细胞(或经转导以包含编码本文所描述的CD19 CAR的核酸序列的宿主细胞)。本公开提供了用于治疗需要治疗的受试者的癌症或抑制需要治疗的受试者的肿瘤生长的方法,所述方法包括:向所述受试者施用表达如本文所提供的任一个CD19CAR的T细胞群体。在一些实施例中,由T细胞表达的CD19 CAR包括与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0036] 优选地,所述病症是癌症,包括但不限于血液学乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、黑色素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、食道癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神经胶质瘤和胶质母细胞瘤。

[0037] 在各个实施例中,所述癌症是选自由以下组成的组的血液学癌症:急性淋巴细胞白血病(ALL)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)和伯基特氏淋巴瘤(BL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性髓细胞白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金氏淋巴瘤(HL)和慢性髓细胞白血病(CML)。在一些实施例中,所述血液学癌症选自由以下组成的组:非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、伯基特氏淋巴瘤(BL)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)和急性淋巴细胞白血病(ALL)。

## 附图说明

[0038] 图1A是通过将抗CD19抗体的scFv与CD8 $\alpha$ 和CD28的铰链区、CD28跨膜结构域(TMD)以及CD28和CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域连接而产生的编码CD19 CAR的构建体的示意图。向N端添加用于检测CAR表达的信号肽和myc标签。图1B是通过将抗CD19抗体的scFv与CD8 $\alpha$ 和CD28的铰链区、CD28跨膜结构域(TMD)以及CD28和CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域连接而产生的编码CD19 CAR的构建体的示意图。向N端添加信号肽。附图不按比例绘制。

[0039] 图2提供了包含编码如图1B所描绘的CAR的核酸序列的逆转录病毒载体的载体图。

[0040] 图3提供了在第一实验中转导的T细胞群体的流式细胞术分析,所述实验包含SEQ ID NO:15的CD19 CAR构建体(CD19 CAR2-63),所述构建体用针对CD3的抗体染色以检测T细胞受体的表达(Y轴)并且用与Fc区连接的CD19抗原染色以检测CD19 CAR的表达(X轴)。上图示出了未经转导的对照T细胞,中图示出了从用CD19 CAR2-63转导的PBMC中分离的T细胞,并且下图示出了从脐带血(CB)中分离的T细胞。

[0041] 图4提供了在第二实验中转导的T细胞群体的流式细胞术分析,所述实验包含SEQ ID NO:15的CD19 CAR构建体(CD19 CAR2-63),所述构建体被与Fc区连接的CD19抗原识别,以检测CD19 CAR表达(Y轴)。左上图示出了从PBMC中分离的未经转导的对照T细胞,右上图示出了从用CD19 CAR2-63转导的PBMC中分离的T细胞。左下图示出了从CB中分离的未经转

导的对照T细胞,右上图示出了从用CD19 CAR2-63转导的CB中分离的T细胞。

[0042] 图5示出了从PBMC和CB中分离的未经转导的T细胞和从PBMC和CB中分离的用CD19 CAR2-63转导的T细胞产生干扰素 $\gamma$  (IFN $\gamma$ )。将T细胞与不表达CD19的K562肿瘤细胞、被工程化为表达CD19的K562肿瘤细胞和表达CD19的Raji肿瘤细胞一起培养。

[0043] 图6示出了从PBMC和CB中分离的未经转导的T细胞和从PBMC和CB中分离的用CD19 CAR2-63转导的T细胞产生白介素2 (IL-2)。将T细胞与不表达CD19的K562肿瘤细胞、被工程化为表达CD19的K562肿瘤细胞和表达CD19的Raji肿瘤细胞一起培养。

[0044] 图7示出了从PBMC和CB中分离的未经转导的T细胞和从PBMC和CB中分离的用CD19 CAR2-63转导的T细胞产生肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )。将T细胞与不表达CD19的K562肿瘤细胞、被工程化为表达CD19的K562肿瘤细胞和表达CD19的Raji肿瘤细胞一起培养。

[0045] 图8提供了使用来自PBMC或脐带血 (CB) 的CD19 CAR2-63转导的T细胞或未经转导的T细胞进行的细胞毒性测定的结果。将未经转导的对照和CD19 CAR转导的T细胞与表达CD19的K562肿瘤细胞以指定的比率一起温育2天。

[0046] 图9提供了使用来自PBMC或脐带血 (CB) 的CD19 CAR2-63转导的T细胞或未经转导的T细胞进行的细胞毒性测定的结果。将未经转导的对照和CD19 CAR转导的T细胞与表达CD19的Raji肿瘤细胞以指定的比率一起温育2天。

[0047] 图10提供了用肿瘤细胞接种随后未经处理或用T细胞处理或用CD19 CAR2-63转导或作为未用CAR转导的对照的小鼠的体内成像。用标记的Raji (表达CD19) 肿瘤细胞静脉接种免疫功能受损的NSG小鼠。将小鼠用不同剂量的CD19 CAR-T细胞静脉处理,其中T细胞是pan T细胞或gd T细胞,或者作为对照,小鼠未经处理或用未用CD19 CAR构建体转导的T细胞处理。通过生物发光成像 (IVIS) 每周评估肿瘤负荷。对于T细胞处理的小鼠,表达抗CD19-CAR2-63构建体的T细胞比未经转导的T细胞是更有效的治疗,其中表达抗CD19-CAR2-63构建体的pan T细胞以 $10^7$ 个细胞的剂量递送提供了最大的益处。

[0048] 图11提供了肿瘤大小的图,所述图基于接种有肿瘤细胞随后未经处理或用未用CAR转导或用CD19 CAR2-63转导的gd或pan T细胞处理的小鼠的体内成像。还示出了处理过程中小鼠体重的变化的图。

[0049] 图12提供了接种有肿瘤细胞且未经治疗或用CD19 CAR-T细胞或未经转导的T细胞处理的小鼠的存活率曲线。

[0050] 图13提供了接种有肿瘤细胞且未经治疗或用CD19 CAR-T细胞或未经转导的T细胞处理的小鼠的存活率曲线。

## 具体实施方式

[0051] 所公开的嵌合抗原受体 (CAR) 构建体与表达CD19的肿瘤细胞优先结合。提供了经转化的T细胞,其包含编码scFv抗体的CD19 CAR构建体,所述scFv抗体具有轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域,所述VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列,所述VH结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列。

[0052] 定义

[0053] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理

解的含义。通常,适合于本文所描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、基因学、转基因细胞产生、蛋白质化学和核酸化学以及杂交的术语是本领域众所周知和常用的。

[0054] 除非另外说明,否则通常根据本领域熟知的常规程序以及如本文中引用和讨论的各个一般和更具体的参考文献中所描述的执行本文所提供的方法和技术。

[0055] 在整个本申请中,引用了各种公开、专利和/或专利申请。所述公开、专利和/或专利申请的公开内容特此通过引用整体并入本申请,以更全面地描述本公开所涉及领域的现状。

[0056] 本文提供的标题不是对本公开的各个方面的限制,所述方面可以通过整体参考本说明书来理解。

[0057] 除非本文中上下文另外要求,否则单数术语应包含复数含义,并且复数术语应包括单数含义。除非明确地并且肯定地限于一个指示物,否则单数形式“一个/一种(a或an)”和“所述”和任何词的单数用途包含多个指示物。

[0058] 应理解,替代方案(例如“或”)在本文中的使用用于意指替代方案中的任一个或两个或其任何组合。

[0059] 在本文中使用的术语“和/或”将被视为意指在有或没有另一者的情况下明确公开了指定特征或组分中的每个特征或组分。例如,本文中在如“A和/或B”等短语中使用的术语“和/或”旨在包含“A和B”、“A或B”、“A”(单独)以及“B”(单独)。同样,在如“A、B和/或C”等短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每个方面:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0060] 如本文所用,如本文所用的术语“包括(comprising)”、“包含(including)”、“具有(having)”和“含有(containing)”以及其语法变体旨在是非限制的,使得列表中的一个项或多个项不排除可以被替代或添加到所列项的其它项。应理解的是,当在本文中无论何处用语言“包括”来描述方面时,还提供了关于“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其它类似方面。

[0061] 术语“约”或“大约”意指如本领域的普通技术人员确定的特定值的可接受误差,这将部分取决于如何测量或确定值。例如,术语“约”或“大约”意指在给定值或范围的30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%内。

[0062] 术语“分离的”是指基本上不含其它细胞材料的蛋白质(例如,抗体)或多核苷酸。蛋白质可以通过使用本领域众所周知的蛋白质纯化技术进行分离,使其大体上不含天然相关组分(或与用于产生抗体的细胞表达系统相关的组分)。将分离的细胞从其体内细胞环境中去除,例如,不再与它们体内缔合的组织(例如,血液、肿瘤)缔合,并且可以部分地或基本上与它们体内缔合的组织中存在的其它细胞类型分离或富集。在各个实施例中,分离了编码CD19嵌合抗原受体的本公开的构建体,或包含和/或表达编码CD19嵌合抗原受体的本公开的构建体的宿主细胞。

[0063] 术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,并且是指核苷酸的聚合物。核酸包含天然存在的形式和重组形式。核酸包含DNA分子(cDNA或基因组DNA)、RNA分子(例如,mRNA)、使用核苷酸类似物(例如,肽核酸和非天然存在的核苷酸类似物)产生的DNA或RNA的

类似物以及其杂交物。核酸分子可以是单链或双链的。在一个实施例中,本公开的核酸分子包括编码抗体或其片段或scFv、衍生物、突变蛋白或变体的连续开放阅读框。

[0064] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指氨基酸的聚合物并且不限于任何特定长度。多肽包括天然氨基酸和非天然氨基酸。多肽可以是天然存在的形式或重组形式。这些术语涵盖天然和人工蛋白质、蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物(如突变蛋白、变体、嵌合蛋白和融合蛋白)以及翻译后或以其它方式共价或非共价修饰的蛋白质。肽、多肽或蛋白质可以是单体的或聚合的。多肽包含抗体、抗体链、scFv和嵌合抗原受体构建体。

[0065] “同一性百分比”或“同源性百分比”是指两个多肽之间或两个多核苷酸序列之间相似性的定量测量。两个多肽序列之间的同一性百分比是在所述两个多肽序列之间共享的比对位置处的相同氨基酸的数量的函数,考虑了可能需要被引入以优化所述两个多肽序列的比对的空位的数量和每个空位的长度。以类似方式,两个多核苷酸序列之间的同一性百分比是在所述两个多核苷酸序列之间共享的比对位置处的相同核苷酸的数量函数的函数,考虑了可能需要被引入以优化所述两个多核苷酸序列的比对的空位的数量和每个空位的长度。序列比较和两个多肽序列或两个多核苷酸序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来实现。例如,两个多肽或两个多核苷酸序列的“同一性百分比”或“同源性百分比”可以通过使用GAP计算机程序(GCG Wisconsin Package,10.3版本(加利福尼亚州圣地亚哥的Accelrys公司(Accelrys, San Diego, Calif.))使用其默认参数比较序列来确定。

[0066] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”描述了包括胞外抗原结合蛋白的融合蛋白,优选地源自使单克隆抗体的可变重区和轻区融合的单链可变片段(scFv或sFv),所述单链可变片段与能够激活或刺激免疫细胞的胞内信号传导结构域融合。可替代地,可以使用源自Fab' (而不是源自抗体,例如从Fab文库获得的抗体)的scFv。本文公开了CD19 CAR,其包含与CD19特异性结合的靶向部分。

[0067] 术语“抗体”描述了包括四条多肽链、两条重链(H)和两条轻链(L)的免疫球蛋白(Ig)分子,或其保留了Ig分子的基本表位结合特征的任何功能片段、突变体、变体或衍生物。术语抗体包含例如单链可变片段抗体(scFv)。

[0068] 术语“抗CD19抗体”和“与CD19结合的抗体”是指能够与CD19特异性结合的抗体。

[0069] “单链抗体”或“scFv”或“单链可变片段[抗体]”是 $V_L$ 和 $V_H$ 区通过连接子(例如,氨基酸残基的合成序列)接合以形成连续蛋白质链的抗体。在一个实施例中,连接子足够长以允许蛋白质链自身折叠并且形成单价抗原结合位点(参见例如,Bird等人,1988,《科学(Science)》242:423-26以及Huston等人,1988,《美国国家科学院院刊》85:5879-83)。

[0070] Fab片段是具有 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 和 $C_{H1}$ 结构域的单价片段; $F(ab')_2$ 片段是具有在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段具有 $V_H$ 和 $C_{H1}$ 结构域;Fv片段具有抗体单臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域;并且dAb片段具有 $V_H$ 结构域、 $V_L$ 结构域或者 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域的抗原结合片段(美国专利第6,846,634号和第6,696,245号)。

[0071] 术语“铰链”是指通常在蛋白质的两个结构域之间发现并且可以允许结构域中的一个或两个结构域相对于彼此整体构建体和移动的灵活性的氨基酸区段。在结构上,铰链区通常包括约8个至约100个氨基酸,例如,约9个至约75个氨基酸、约10个至约70个氨基酸或约20个至约65个氨基酸。在各个实施例中,铰链区的长度为8个、9个、10个、11个、12个、13

个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个或100个氨基酸。CAR的铰链区可以源自天然存在的蛋白质的铰链区，如CD8铰链区、CD8 $\alpha$ 铰链区、CD28铰链区、CD3 $\zeta$ 铰链区、CD4铰链区、抗体（例如，IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体）的铰链区或接合抗体或其任何的片段的恒定结构域CH1和CH2的铰链区。铰链区可以源自免疫球蛋白超家族成员或抗体并且可以包括或不包括抗体的一个或多个恒定区。铰链区可以包括抗体的铰链区和抗体的CH3恒定区，或者铰链区可以包括抗体的铰链区和抗体的CH2恒定区和CH3恒定区。铰链区也可以是非天然存在的肽。铰链区可以定位于CAR的scFv部分的C端与CAR的跨膜结构域的N端之间。在一些实施例中，铰链区包括包含来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4免疫球蛋白分子的上部铰链序列、核心铰链序列或下部铰链序列中的任何一个区或两个或更多个区的任何组合。在一些实施例中，铰链区包括IgG1上部铰链序列EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:17)。在一些实施例中，铰链区包括IgG1核心铰链序列CPXC，其中X是P、R或S。在一些实施例中，铰链区包括下部铰链/CH2序列PAPELLGGP (SEQ ID NO:18)。在一些实施例中，铰链与具有氨基酸序列SVFLFPPKPKDT (SEQ ID NO:19)的Fc区(CH2)接合。在一个实施例中，铰链区包含上部铰链、核心铰链或下部铰链的氨基酸序列并且包括EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP (SEQ ID NO:20)。在一些实施例中，铰链区包括可以形成至少一个、两个、三个或更多个链间二硫键的一个、两个、三个或更多个半胱氨酸。

[0072] “载体”是指可以可操作地与外部遗传物质（例如，核酸转基因）连接的核酸分子（例如，DNA或RNA）。载体可以是单链或双链的核酸分子。载体可以是线性或环状核酸分子。载体可以用作媒介以将外部遗传物质引入到细胞（例如，宿主细胞）中。一种类型的载体是“质粒”，其是指线性或环状的双股染色体外DNA分子，其可以与转基因连接，并能够在宿主细胞中复制，且转录和翻译转基因。病毒载体通常含有可以与转基因连接的病毒RNA或DNA主链序列。病毒主链序列可以被修饰以停止感染但保留病毒主链和共连接转基因插入到宿主细胞基因组中。病毒载体的实例包含逆转录病毒、慢病毒和腺病毒载体。某些载体能够在其被引入到其中的宿主细胞中进行自主复制（例如，包括细菌复制起点的细菌载体以及附加型哺乳动物载体）。其它载体（例如，非附加型哺乳动物载体）在引入到宿主细胞中时被整合到所述宿主细胞的基因组中，并且由此与宿主基因组一起复制。“表达载体”是一种可以含有一个或多个调节序列（如诱导型启动子和/或组成型启动子，或核糖体结合位点）的引导与转导到宿主细胞中的表达载体连接的转基因的转录或转录与翻译的载体。

[0073] 当转基因与载体之间存在连接以允许载体中含有的载体序列发挥功能或表达时，转基因与载体“可操作地连接”。载体序列可以是以下中的任一种或任何组合：复制原始序列、诱导型或组成型启动子或增强子序列、至少一个可选择的标志物序列、5'LTR序列和3'LTR序列以及任选地病毒env、pol和/或gag序列。

[0074] 当调节序列影响转基因的表达（例如，表达水平、定时和/或定位）时，转基因与调节序列“可操作地连接”。“调节序列”是影响与其可操作地连接的转基因的表达（例如，表达水平、定时或定位）的核酸序列。调节序列可以例如直接或通过一个或多个其它分子（例如，与调节序列和/或核酸结合的多肽）的作用向经调节的核酸施加其效应。调节序列可以是载体的一部分。调节序列的实例包含启动子、增强子和其它表达控制元件（例如，聚腺苷酸化信号）。调节序列的另外的实例描述于例如Goeddel, 1990,《基因表达技术：酶学方法 (Gene

Expression Technology:Methods in Enzymology) 185,加利福尼亚州圣地亚哥的学术出版社(Academic Press,San Diego,Calif.)和Baron等人,1995,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》23:3605-3606中。

[0075] “宿主细胞”或“或宿主细胞群体”是指其中已经引入外来(外源性)核酸的细胞(或其群体)。外来核酸可以包含与转基因可操作地连接的表达载体,并且宿主细胞可以用于表达外来核酸(转基因)。在一个实例中,宿主细胞(或其群体)可以引入有与编码本文所描述的嵌合抗原受体(CAR)的核酸可操作地连接的表达载体。宿主细胞(或其群体)可以是培养细胞或者可以从受试者中提取。在不考虑通路的数量的情况下,宿主细胞(或其群体)包含原代受试者细胞和其后代。与亲本细胞相比,后代细胞可能携带或可能不携带相同的遗传物质。宿主细胞涵盖后代细胞。

[0076] 宿主细胞可以是原核生物,例如大肠杆菌(*E. coli*),或其可以是真核细胞,例如单细胞真核生物(例如,酵母或其它真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如,人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤细胞。宿主细胞的实例包含RPMI8226(Gentry等人,2004《白血病研究(Leuk. Res.)》28(3):307-313)和人慢性髓性白血病细胞系K562。其它实例包含猴肾细胞(ATCC CRL 1651)的COS-7系(参见Gluzman等人,1981,《细胞(Cell)》23:175)、L细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其衍生物,如在无血清培养基中生长的Veggie CHO以及相关细胞系(Rasmussen等人,1998,《细胞技术学(Cytotechnology)》28:31)或缺乏DHFR的CHO菌株DX-B11(Urlaub等人,1980,《美国国家科学院院刊》77:4216-20)、HeLa细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系、源自非洲绿猴肾细胞系CV1的CV1/EBNA细胞系(ATCC CCL 70)(McMahan等人,1991,《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)》10:2821)、人胚肾细胞(如293,293EBNA或MSR 293)、人表皮A431细胞、人Colo205细胞、其它经转化的灵长类动物细胞系、正常二倍体细胞、源自原代组织的体外培养物的细胞株、原代外植体、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。在一个实施例中,宿主细胞是哺乳动物宿主细胞,例如人宿主细胞。通常,宿主细胞是原代细胞或可以被引入有编码外源性多肽的核酸的培养细胞,所述核酸随后可以在宿主细胞中表达。应当理解,术语宿主细胞是指特定受试者细胞,并且还指此类细胞的后代或潜在后代。因为某些修饰可能由于例如突变或环境影响而在后续世代中发生,所以此类后代实际上可能不与亲本细胞相同,但仍包含在如本文中所述的术语的范围内。

[0077] 宿主细胞描述了已经以任何方式被修饰、转染、转导、转化和/或操纵以表达如本文所公开的抗CD19-CAR构建体的任何细胞(包含其后代)。优选地,宿主细胞是人T细胞、胎盘细胞或NK细胞。

[0078] “Pan T细胞”是指未按T细胞类型进行选择,而是包含从其中获得它们的生物样品的所有T细胞类型的T细胞群体,例如,pan T细胞可以包含CD4+“辅助”T细胞、CD4+CD25+调节性T细胞、CD8+细胞毒性T细胞、 $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta$ 或gd) T细胞、自然杀伤(NK) T细胞和“双阴性”T细胞。作为非限制性实例,生物源作为非限制性实例可以是外周血、PBMC、脐带血(CB)或胎盘血。

[0079] 如本文所用,“同种异体”是指源自与引入材料的个体相同物种的不同个体的任何材料(如细胞)。当一个或多个基因座上的基因不同时,两个或更多个个体被认为是彼此同种异体的。

[0080] 术语“经转染的”或者“经转化的”或“经转导的”是指将外源核酸(例如,转基因)转

移或引入到宿主细胞中的过程。术语“经转导”用于指通过病毒载体,例如通过宿主细胞的病毒感染将核酸导入到宿主细胞中。“经转染的”、“经转化的”或“经转导的”宿主细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞,或者是直接转化、转染或转导的细胞的后代。

[0081] 转基因,如所公开的编码CD19嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列,可以与用于将转基因引入到宿主细胞中的媒介的载体(包含病毒载体)可操作地连接。引入(例如,通过转导、转染或转化)到宿主细胞中的转基因可以瞬时引入到或优选地稳定整合到宿主细胞的基因组中。引入到宿主细胞中的转基因可以在后代细胞中繁殖。载体可以是单链或双链DNA或RNA载体。载体包含引导转基因在宿主细胞中表达的表达载体。合适的载体包含表达载体,其可以含有复制原始序列、诱导型或组成型启动子序列和至少一个可选择标志物序列,其中这些序列在包装细胞和/或宿主细胞中是功能性的。用于将转基因引入到宿主细胞中的病毒载体包含源自逆转录病毒科的载体,所述载体包含逆转录病毒载体和慢病毒载体。逆转录病毒载体可以用于转导分裂宿主细胞,并且慢病毒载体可以用于转导非分裂宿主细胞。用与表达载体连接的期望转基因转导的宿主细胞包含T细胞、胎盘源性自然杀伤宿主细胞和脐带血源性自然杀伤宿主细胞。

[0082] 逆转录病毒载体可以源自任何鸟类或哺乳动物来源。逆转录病毒载体能够感染包含小鼠、大鼠和人类的几种不同物种的宿主细胞(例如,双嗜性的),或者可以具有有限的宿主范围(例如,嗜生态的)。逆转录病毒载体可以源自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)(例如,MFG载体或其衍生物,Riviere等人(1995)《美国国家科学院院刊》92:6733-6737)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)。

[0083] 在典型的第一代逆转录病毒转移载体(例如, $\gamma$ 逆转录病毒载体)系统中,编码逆转录病毒gag、pol和env的序列可以用期望的转基因替代,并且转基因的两侧上可以侧接顺式作用长末端重复(LTR)序列。gag序列和pol序列可以携带在包装质粒上,env序列可以单独携带在包膜质粒上,并且这三种病毒序列的表达反式作用。转移载体(含有转基因)以及包装质粒和包膜质粒在存在转染试剂的情况下与包装细胞反应,以将载体和质粒转导到包装细胞中。经转导的包装细胞产生含有感染性病毒体的细胞培养上清液,所述感染性病毒体含有携带转基因的转移载体。经转导的宿主细胞是通过宿主细胞与病毒体上清液反应产生的。转导后,逆转录病毒转移载体(携带转基因)整合到宿主细胞的基因组中(Morgan和Boyerinas 2016《生物医药(Biomedicines)》4(2):9“综述:T细胞的基因修饰(Review: Genetic Modification of T Cells)”)。逆转录病毒转移载体也可以含有引导转基因的诱导型或组成型转录的启动子。第二代逆转录病毒载体系统通常包含在包装细胞系中稳定表达的gag、pol和env序列,这消除了对单独包装质粒和包膜质粒的需要。包装细胞系与包装载体(携带转基因)反应以产生经转导的包装细胞和病毒体上清液。不含Phoenix辅助细胞的逆转录病毒包装细胞系是第二代逆转录病毒系统的实例。逆转录病毒载体用于宿主细胞转导(WO2014/055668)。

[0084] 源自HIV、SIV或FIV的慢病毒载体可以用于将转基因引入到宿主细胞中。已经开发了若干代慢病毒载体。第一代慢病毒系统类似于第一代逆转录病毒系统,因为它们采用转移载体(携带转基因)、包装质粒(携带gag、pol、tat、rev和辅助序列)和包膜质粒(携带异源env序列)。第二代慢病毒系统采用转移载体(转基因)、包装质粒(去除gag、pol、tat和rev以

及辅助序列)和包膜质粒(携带异源env序列)。第三代慢病毒系统,有时被称为自失活(SIN)系统,采用转移载体(转基因和去除tat的3'LTR)、第一包装质粒(gag和pol)、第二包装质粒(rev)和包膜质粒(携带异源env序列)。类似于逆转录病毒系统,这些慢病毒系统中的任何一种都涉及使载体/质粒与包装细胞和转导试剂反应,以产生含有病毒体的细胞培养上清液,所述病毒体进而用于转导宿主细胞。慢病毒载体用于转导宿主细胞(WO2012/031744;美国专利8,802,374;以及U.S.2016/0152723)。

[0085] 用于将转基因引入到宿主细胞中的其它病毒载体包含猿猴病毒40(SV40)、单纯疱疹病毒1、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和劳氏肉瘤病毒(RSV)(Gross 1989《美国国家科学院院刊》86:10024-10028)。

[0086] 表达载体通常包含引导包装细胞和/或要引入有转基因的宿主细胞中的诱导型或组成型表达(例如,转录)的启动子和/或增强子序列。组成型启动子包含逆转录病毒LTR、即刻早期巨细胞病毒(CMV)启动子、延伸生长因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人类免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、莫洛尼鼠白血病毒(MoMuLV)LTR启动子、禽白血病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒即刻早期启动子、劳氏肉瘤病毒启动子、PGK(磷酸甘油酸激酶)、UbC(泛素C)、MLV(莫洛尼白血病毒)和CAG(巨细胞病毒早期增强子元件、来自鸡 $\beta$ -肌动蛋白的第一外显子和内含子的启动子以及兔 $\beta$ -珠蛋白的剪受体)增强子序列。诱导型启动子序列包含四环素操纵子(TetO)位点(Sakemura 2016《癌症免疫学研究(Cancer Immunology Research)》4(8):658-668)和来自大肠杆菌的lac阻遏物系统。*E. coli*.适于从慢病毒载体高表达的启动子包含人泛素、MHC I类、MHC II类和 $\beta$ 2微球蛋白启动子(WO 2016/012623)。逆转录病毒表达载体和慢病毒表达载体可从包含应用生物材料公司(Applied Biological Materials,ABM)(加拿大温哥华)和阿德基因公司(Addgene)(马萨诸塞州沃特敦)的若干个来源商购获得。

[0087] 术语“靶细胞”是表达一种或多种靶多肽的细胞,这使得它们可被抗体或抗体衍生物识别。在一个实施例中,靶细胞包含表达CD19多肽的癌症(肿瘤)靶细胞,其被本公开的嵌合抗原受体(CAR)构建体识别以进行结合。

[0088] CD19嵌合抗原受体(CD19 CAR)

[0089] 本公开描述了一种新的CAR构建体,其包括在第二代CAR构建体支架上的抗CD19抗体,并且通常具有不同的组成跨膜结构域和胞内结构域。本公开提供了一种核酸序列,其编码用于转导到T细胞中的CD19 CAR,所述T细胞包含pan T细胞、从胎盘组织或脐带血中分离的T细胞或 $\gamma\delta$ (gd)T细胞,其中CAR将T细胞引导至表达CD19的肿瘤细胞。

[0090] CAR通常是通过将抗体的抗原识别结构域与T细胞的受体的信号传导结构域接合而构建的。CAR构建体将通常含有编码胞外区的序列,例如识别癌细胞上存在的抗原(例如,CD19)的抗体的单链可变片段(scFv);编码胞内区例如模拟TCR激活的T细胞受体如(TCR) $\zeta$ 链的序列;以及编码至少一个源自CD28或4-1BB的信号传导结构域以模拟共刺激的序列。用编码CAR的核酸序列修饰T细胞使T细胞具有重新靶向的抗体型抗肿瘤细胞毒性。因为杀伤是MHC非限制性的,所述方法为所有携带相同抗原的患者提供了一种通用疗法。这些用CAR工程化的T细胞通常被称为“CAR-T细胞”、“设计T细胞”或“T体”(Eshhar等人《美国国家科学院院刊》90(2):720-724,1993;Ma等人,《癌症化疗与生物应答调节剂杂志(Cancer Chemother.Biol Response Modif.)》20:315-341,2002)。

[0091] 抗CD19抗体轻链可以包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,并且重链可以包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。抗CD19 scFv抗体可以包括氨基酸序列SEQ ID NO:12或与SEQ ID NO:12具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0092] 所公开的CD19 CAR进一步包括铰链区,优选地包含CD8铰链区(例如,SEQ ID NO:4)、与SEQ ID NO:4具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或SEQ ID NO:4的功能片段。所公开的CD19 CAR优选地进一步包括另外的胞外结构域,优选地CD28胞外结构域或铰链区(SEQ ID NO:5)、与SEQ ID NO:5具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的铰链区、或其功能片段。整个铰链区的长度可以为至少65、70、75、80或85个氨基酸,并且可以与SEQ ID NO:13具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0093] 所公开的CD19 CAR进一步包括跨膜结构域,优选地来自选自以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、T细胞受体的 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、LFA-1T细胞共受体、CD2 T细胞共受体/粘附分子、CD8 $\alpha$ 以及其组合。优选地,跨膜结构域来自CD28跨膜结构域(SEQ ID NO:6),或其功能片段。

[0094] 所公开的CD19 CAR进一步包括胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域包括来自以下组成的组的信号传导结构域:CD3- $\zeta$ 链、4-1BB、CD28以及其组合。如果存在两个信号传导结构域,则第二个被称为共刺激信号传导结构域。优选地,共刺激信号传导结构域包括但不限于以下蛋白质的胞内结构域或其片段:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体以及其任何组合。在一些实施例中,胞内信号传导结构域包括CD28信号传导结构域。在另外的实施例中,CD28信号传导结构域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能片段。在一些实施例中,胞内信号传导结构域包括CD3- $\zeta$ 信号传导结构域。在另外的实施例中,CD3- $\zeta$ 信号传导结构域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能片段。

[0095] 因此,本公开涵盖分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包括编码所公开的CD19 CAR构建体的序列。应当注意的是,在描述氨基酸序列的情况下,也包含编码所述氨基酸序列的核酸序列。

#### [0096] 1. 胞外抗CD19结合蛋白

[0097] 本公开提供了一种CD19 CAR,其包括与CD19结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包括轻链可变(VL)结构域,所述VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。优选地,VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少96%同源的氨基酸序列,或者VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者VL结构域包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0098] VL结构域和VH结构域可以通过连接子接合在scFv中,所述连接子可以具有例如一至八个G<sub>4</sub>S重复单元,例如但不限于GS(G<sub>4</sub>S)连接子。在一些实例中,连接子具有三个G<sub>4</sub>S单元。

[0099] 进一步,本公开提供了一种包括与CD19结合的抗原结合蛋白的CAR,其中所述抗原

结合蛋白包括重链可变 (VH) 结构域,所述VH结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或者VH结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列,或者所述VH结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述VH结构域包括2,或者VH结构域包括与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。在一些优选的实施例中,所公开的CD19 CAR包括scFv,所述scFv包括轻链和重链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的可变结构域,所述重链具有包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变结构域。

[0100] 在本文所提供的一些实施例中,与本文所描述的CAR构建体的氨基酸序列相比,CD19CAR具有一个或多个变化,包含氨基酸取代、缺失和/或插入,只要变体CAR包括与SEQ ID NO:14至少95%相同的氨基酸序列。

[0101] 优选地,所公开的CD19 CAR包括scFv,所述scFv包括轻链和重链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的可变结构域,所述重链具有包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变结构域。

[0102] 单链抗体可以通过经由氨基酸桥(短肽连接子)连接重链和轻链可变结构域(Fv区)片段而形成,从而产生单条多肽链。此类单链Fv(scFv)已通过编码两种可变结构域多肽(VL和VH)的DNA之间编码肽连接子的DNA融合来制备。所得的多肽可以自身折叠形成抗原结合单体,或者它们可以形成多聚体(例如,二聚体、三聚体或四聚体),这取决于两个可变结构域之间的柔性连接子的长度(Kortt等人,1997,《蛋白质工程(Prot.Eng.)》10:423; Kortt等人,2001,《生物分子工程(Biomol.Eng.)》18:95-108)。通过组合不同的包括VL和VH的多肽,可以形成与不同表位结合的多聚体scFv(Kriangkum等人,2001,《生物分子工程》18:31-40)。为产生单链抗体而开发的技术包含以下中描述的那些技术:美国专利4,946,778;Bird,1988,《科学》242:423;Huston等人,1988,《美国国家科学院院刊》85:5879;Ward等人,1989,《自然》334:544以及de Graaf等人,2002,《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》178:379-87。如本文所提供的可以接合CD19 CAR中的scFv的VL区和VH区的连接子的一个实例是SEQ ID NO:3的连接子。

#### [0103] 2. 跨膜结构域

[0104] 所公开的CD19 CAR构建体的跨膜结构域描述了在细胞膜,优选地哺乳动物细胞膜中热力学稳定的任何多肽结构。适用于所公开的CD19 CAR构建体的跨膜结构域可以从任何天然跨膜蛋白或其片段中获得。可替代地,跨膜结构域可以是合成的、非天然存在的跨膜蛋白或其片段,例如在细胞膜(例如,哺乳动物细胞膜)中热力学稳定的疏水蛋白区段。

[0105] 优选地,用于CAR的跨膜结构域源自选自以下组成的组的膜蛋白:CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、CD16、OX40/CD134、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、TCR $\zeta$ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、LFA-1T细胞共受体、CD2 T细胞共受体/黏附分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B。优选地,跨膜结构域源自CD8 $\alpha$ 、4-1BB/CD137、CD28或CD34。

[0106] 在本文所提供的各个实施例中,CD19 CAR的跨膜结构域包括源自CD28的氨基酸序列,例如,与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少95%相同、与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少96%相同、或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者跨膜结构域包括与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少98%相同或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少99%相

同的氨基酸序列。在CD19 CAR的一些实施例中,所述CAR包括SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

### [0107] 3. 胞内结构域

[0108] 本文所公开的CD19 CAR包括至少一个胞内信号传导结构域。信号传导结构域通常负责细胞的至少一种正常效应子功能的激活。术语“效应子功能”描述了细胞的专门功能。例如,T细胞或NK细胞的效应子功能可以包含细胞溶解活性或辅助活性。“信号传导结构域”描述了蛋白质的一部分,所述部分转导效应子功能信号并引导细胞执其专门功能。尽管通常可以采用整个胞内信号传导结构域,但是在很多情况下,没有必要使用整个链或结构域。在使用胞内信号传导结构域的截短部分的程度上,可以使用此类截短部分代替完整结构域,只要其转导效应子功能信号即可。

[0109] 初级信号传导结构域以刺激性方式或以抑制性方式调节TCR复合物的初级激活。以刺激性方式起作用的初级信号传导结构域可含有信号传导基元,所述信号传导基元称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。用于CD19 CAR的含有ITAM的初级信号传导结构域包含TCR $\zeta$  (CD3 $\zeta$ )、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的信号传导结构域。优选地,初级信号传导结构域是CD3 $\zeta$ 或CD28。

[0110] 在各个实施例中,CD19 CAR可以进一步包括共刺激信号传导结构域。用于嵌合受体的共刺激信号传导结构域的实例是选自由以下组成的组的共刺激蛋白的胞质信号传导结构域:B7/CD28家族的成员(B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC和PDCD6);TNF超家族的成员(4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLYS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素- $\alpha$ /TNF- $\beta$ 、OX40/TNFRSF4、OX40配体/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- $\alpha$ 和TNF RII/TNFRSF1B);白介素-1受体/toll样受体(TLR)超家族的成员(TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9和TLR10);SLAM家族的成员(2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6和SLAM/CD150);CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLA I类、HLA-DR、ikaros、整合素 $\alpha$ 4/CD49d、整合素 $\alpha$ 4 $\beta$ 1、整合素 $\alpha$ 4 $\beta$ 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP10、DAP12、MYD88、TRIF、TIRAP、TRAF、血凝素-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)和NKG2C。优选地,共刺激结构域包括选自由以下组成的组的激活受体蛋白的胞内结构域: $\alpha$ <sub>4</sub> $\beta$ <sub>1</sub>整合素、 $\beta$ <sub>2</sub>整合素(CD11a-CD18、CD11b-CD18、CD11b-CD18)、CD226、CRTAM、CD27、NKp46、CD16、NKp30、NKp44、NKp80、NKG2D、KIR-S、CD100、CD94/NKG2C、CD94/NKG2E、NKG2D、PEN5、CEACAM1、BY55、CRACC、Ly9、CD84、NTBA、2B4、SAP、DAP10、DAP12、EAT2、FcR $\gamma$ 、CD3 $\zeta$ 和ERT。优选地,共刺激结构域包括选自由以下组成的组的抑制性受体蛋白的胞内结构域:KIR-L、LILRB1、CD94/NKG2A、KLRG-1、NKR-P1A、TIGIT、CEACAM、SIGLEC 3、SIGLEC 7、SIGLEC9和LAIR-1。优选地,共刺激结构域包括选自由以下组成的组的蛋白质的胞内结构域:CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体。

[0111] 在本文所提供的CD19 CAR的各个实施例中,CD19 CAR包含第一信号传导结构域和第二信号传导结构域。例如,所述CD19 CAR的第一信号传导结构域可以包括源自CD28例如SEQ ID NO:7的信号传导结构域。所述第一信号传导结构域可以包括与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少95%相同、与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少96%相同、或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述第一信号传导结构域可以包括与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,所述第一信号传导结构域包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0112] 如本文所提供的包括第二信号传导结构域的CD19 CAR可以例如包括源自CD3 $\zeta$ 例如SEQ ID NO:8的信号传导结构域。所述第二信号传导结构域可以包括与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少95%相同、与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少96%相同、或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述第二信号传导结构域可以包括与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,所述第二信号传导结构域包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

#### [0113] 4. 铰链区

[0114] CD19 CAR可以进一步包括铰链区。铰链区定位于scFv抗体区与跨膜结构域之间。铰链区是通常在蛋白质的两个结构域之间发现并且允许结构域中的一个或两个结构域相对于彼此CD19 CAR和移动的灵活性的氨基酸区段。铰链区可以包括约7个至约120个氨基酸,例如,约8个至约100个氨基酸、约10个至约90个氨基酸或约50个至约90个氨基酸。优选地,铰链区包括至少65个氨基酸,例如,至少65个、至少70个、至少75个、至少80个或至少85个氨基酸。铰链区可以是天然存在的蛋白质的铰链区,或者源自天然存在的蛋白质的铰链区,并且可以源自多于一种多肽的铰链区。在各个实施例中,铰链区包括CD8铰链区,例如CD8 $\alpha$ 铰链区或与其具有至少95%同一性的序列,并且进一步包括CD28铰链区或与其具有至少95%同一性的序列。优选地,铰链区安置于scFv的C端与CAR跨膜结构域的N端之间。

[0115] 优选地,所述CD19 CAR的铰链区包括与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。例如,铰链区可以包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列。优选地,CD19 CAR的铰链区进一步包括与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。例如铰链区可以包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一些优选的实施例中,铰链区包括SEQ ID NO:13的序列或与其具有至少95%同一性的序列。

#### [0116] 5. 信号肽

[0117] 信号序列是将多肽靶向细胞中的期望位点如细胞的分泌通路的肽序列,并且允许CD19 CAR整合和锚定到细胞膜的脂双层中。由CD19 CAR构建体编码的信号肽可以定位于编码的CAR的N端,并且在要表达CAR的细胞类型中是可操作的。优选地,信号肽在CAR整合到细胞膜中期间被切割,并且不存在于宿主细胞表达的成熟CAR上。

[0118] 在各个实例中,如本文所提供的CD19 CAR的信号序列源自免疫球蛋白超家族的蛋白质的信号序列,并且可以源自例如免疫球蛋白重链信号序列,或在细胞膜上表达的分子例如CD8 $\alpha$ 、CD28或CD16的信号序列。在一些实施例中,如本文所提供的CD19 CAR的信号序列包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或者信号序列包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少96%相同或97%相同的氨基酸序列,或者信号序列包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少98%相同或与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少99%相同的氨基

酸序列。在示例性实施例中,信号序列包括SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

#### [0119] 宿主细胞

[0120] 用所公开的CD19构建体转导分离的宿主细胞或宿主细胞群体以表达CD19 CAR。宿主细胞可以用例如本文所公开的慢病毒或逆转录病毒转导。在替代方案中,宿主细胞可以通过CRISPR/Cas方法产生,例如,如US 20200224160和WO 2020185867中所公开的,所述文献通过引用并入本文。

[0121] 在一些实施例中,宿主细胞是患者源性分离的T细胞,即自体T细胞。将此类自体T细胞群体从患者中获得(例如,从外周血中获得,所述外周血被加工以提供T细胞从其中分离的外周血单核细胞(PBMC))、分离并扩增。然后用如本文所公开的CD19 CAR构建体转导来源于患者的分离和扩增的T细胞,以获得经转导的CD19 CAR-T细胞群体,所述细胞通常被扩增并返回(施用)给个体患者。

[0122] 在其它实施例中,宿主细胞是源自怀孕之后胎盘或脐带血(CB)的培养T细胞。此类T细胞群体从非源自患者的组织中获得(同种异体)。将T细胞分离,并且然后扩增。然后用如本文所公开的CD19 CAR构建体转导经扩增的胎盘或CB T细胞,以获得经转导的CD19 CAR-T细胞群体。将经转导的CAR-T细胞扩增并施用于与T细胞来源无关的患者。

[0123] 本公开提供了用如本文所提供的CD19 CAR构建体转导的表达CD19 CAR的培养T细胞。T细胞可以从PBMC中分离,或者可以从胎盘组织或脐带血(CB)中分离。

#### [0124] CD19 CAR的治疗方法和用途

[0125] 本公开提供了用于治疗有需要的受试者的癌症或抑制有需要的受试者的肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用包括CD19 CAR的分离的宿主细胞,或经转导的宿主细胞群体。可以使用本文所公开的CD19 CAR治疗血液学癌症。可以使用本公开的方法治疗的血液学癌症的实例包含非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、伯基特氏淋巴瘤(BL)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、B急性淋巴细胞白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、T急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)和慢性髓细胞白血病(CML)。例如,可以向患者施用分离的CD19 CAR-T细胞来治疗非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)或B急性淋巴细胞白血病(ALL)。

[0126] 本公开提供了一种抑制表达癌症相关抗原的肿瘤生长的方法,所述方法包括将肿瘤的癌细胞与包括CD19 CAR的经转导的宿主细胞或经转导的宿主细胞群体接触,其中所述宿主细胞是自体T细胞或胎盘源性或CB源性T细胞。

[0127] 经转导的宿主细胞可以以约 $10^1$ 个至约 $10^9$ 个细胞/kg体重的剂量施用。上述剂量的中间范围,例如约 $10^2$ 个至约 $10^8$ 个细胞/kg体重、约 $10^4$ 个至约 $10^7$ 个细胞/kg体重、约 $10^5$ 个至约 $10^6$ 个细胞/kg体重也旨在是本公开的一部分。

[0128] 施用于受试者或患者的宿主细胞可以相对于受试者或患者是同种异体的。

[0129] 经转导的宿主细胞可以以单剂量或多剂量形式施用,并且可以每天施用或优选地以较低的频率施用。

#### [0130] 实例

[0131] 以下实例旨在是说明性并且可以用于进一步理解本公开的实施例并且不应被解释为以任何方式限制本发明教导的范围。

[0132] 实例1:CD19 CAR2构建体:

[0133] 通过框内融合编码单链可变片段(scFv)抗体(SEQ ID NO:12)的序列来组装CD19CAR2构建体(图1A中示意性表示),所述scFv抗体包含通过SEQ ID NO:3的肽连接子序列接合的SEQ ID NO:1的轻链可变区和SEQ ID NO:2的重链可变区。编码信号肽的序列(SEQ ID NO:9)融合在抗CD19 scFv编码序列的上游,并且编码myc标签的序列(SEQ ID NO:10)插入在信号肽编码序列与抗CD19 scFv编码序列之间,前面是引入的氨基酸天冬氨酸和异亮氨酸(SEQ ID NO:11)。抗CD19 scFv编码序列的下游是按顺序(N端至C端)编码以下各项的序列:源自CD8的铰链区(SEQ ID NO:4)、作为连接子的另外两个氨基酸(PR),源自CD28的胞外铰链区(SEQ ID NO:5)、源自CD28的跨膜结构域(SEQ ID NO:6)、源自CD28的胞内信号传导结构域(SEQ ID NO:7)和源自CD3 $\zeta$ 的信号传导结构域(SEQ ID NO:8)。完整的CD19 CAR2前体(具有信号肽)的氨基酸序列,在本文中被称为“CD19 CAR2-63”,作为SEQ ID NO:14提供,并且由SEQ ID NO:15的核酸序列编码。将CD19 CAR2-63构建体克隆到逆转录病毒载体中,以提供图2所示的逆转录病毒载体构建体(SEQ ID NO:16),其中5'LTR用于提供用于驱动CD19 CAR表达的启动子。CD19 CAR2-63的成熟多肽作为SEQ ID NO:23提供。

[0134] 产生了第二构建体,所述第二构建体基本上与第一构建体相同,除了此构建体缺少myc标签序列(在图1B中示意性表示)。此构建体包含编码单链可变片段(scFv)抗体(SEQ ID NO:12)的序列,所述scFv抗体包含通过SEQ ID NO:3的肽连接子序列接合的SEQ ID NO:1的轻链可变区和SEQ ID NO:2的重链可变区。编码抗CD19 scFv(SEQ ID NO:12)的核酸序列在读框内融合成一个序列(N端至C端):源自CD8的铰链区(SEQ ID NO:4)、作为连接子的另外两个氨基酸(PR),源自CD28的铰链区(SEQ ID NO:5)、源自CD28的跨膜结构域(SEQ ID NO:6)、源自CD28的胞内信号传导结构域(SEQ ID NO:7)和源自CD $\zeta$ 的信号传导结构域(SEQ ID NO:8)。所述构建体还包含编码信号肽的序列,所述信号肽定位于整个多肽的N端。完整的CD19 CAR2前体(具有信号肽并且缺少myc标签)的氨基酸序列,在本文中被称为“CD19 CAR2-63a”,作为SEQ ID NO:24提供,并且由SEQ ID NO:25的核酸序列编码。将CD19 CAR2-63a构建体克隆到逆转录病毒载体中,以提供图2示意性所示的逆转录病毒载体构建体(SEQ ID NO:26),其中5'LTR用于提供用于驱动CD19 CAR表达的启动子。CD19 CAR2-63a的成熟多肽作为SEQ ID NO:27提供。

[0135] 表1.序列

SEQ ID NO:	序列	描述
1	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQED IATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	抗 CD19 抗体, 可变轻链
2	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP RKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLLTIKDNSKSKVFLKM NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	抗 CD19 抗体, 可变重链
3	GGGSGGGSGGGGS	连接 VH 和 VL 的肽连接子

[0136]

[0137]

SEQ ID NO:	序列	描述
4	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA	CD8 $\alpha$ 铰链区
5	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP	CD28 铰链区 (胞外结构域/间隔子)
6	FWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 跨膜结构域
7	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 胞内信号传导结构域
8	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3- $\zeta$ 信号传导结构域
9	MEWSWVFLFFLSVTTGVHS	来自小鼠抗体重链的信号肽
10	EQKLI SEEDL	myc 标签
11	<b>D</b> IEQKLI SEEDL	具有 2 个另外氨基酸的 myc 标签
12	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPTYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSVFLKMNLSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	CD19 scFv: V <sub>L</sub> -(G4S) <sub>3</sub> -V <sub>H</sub>
13	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP	CD8 加 CD28 铰链序列
14	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIEQKLI SEEDLDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPTYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSVFLKMNLSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPFWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD19 CAR2-63 (具有信号肽的前体)
15	ATGGAGTGGTCCTGGGTGTTCTGTTTTCTGAGCGTCACAACCGGTGTGCATAGTGATATTGAGCAGAAGCTGATTAGCGAAGAGGACCTGGATATCCAGATGACACAGACCACCAGCAGCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGAGTGACTATCAGCTGCCGGGCATCCCAGGATATTTCTAAGTATCTGAACTGGTACCAGC	编码 CD19 CAR2-63 的 DNA 序列

[0138]

SEQ ID NO:	序列	描述
	AGAAGCCCGACGGCACTGTCAAACCTGCTGATCTACACACC AGTAGACTGCATTTCAGGGGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGATC TGGCAGTGGGACTGACTACTCCCTGACCATCTCTAACCTGG AGCAGGAAGATATTGCCACCTATTTCTGCCAGCAGGGCAAT AACTGCCTTACACTTTTGGCGGGGAACAAAGCTGGAGAT CACTGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGAAGTGGAGGAG GAGGATCAGAGGTGAAACTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTG GTCGCACCTTACAGAGCCTGTCCGTGACATGTAAGTGTCTC CGGAGTGTCTCTGCCCATTACGGCGTCTCTTGGATCCGGC AGCCCCCTAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGG GGAAGTAAACTACCTACTATAATAGTGCTCTGAAATCAAG ACTGACCATCATTAAGGACAACTCTAAAAGTCAGGTGTTTC TGAAGATGAATTCCTGCAGACCGACGATACAGCAATCTAC TATTGCGCCAAACACTACTATTACGGCGGGAGCTATGCCAT GGATTACTGGGGCAGGGAACCTCCGTACCGTGAGCAGCg cTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCG GCGCCACCATCGCGTCGAGCCCCGTCCCTGCGCCAGA GCGGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGG GGCTGGACTTCGCCCCTAGGAAAATTGAAGTTATGTATCCT CCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTAT CCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTT CCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGT GGAGTCCCTGGCTTGTATAGCTTGTAGTAACAGTGGCCTT TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGC ACAGTACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCC ACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTT CGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAG ACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGA GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAG AAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAAGTTGGGATGAA AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTT CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	
16	aagcttgcctgctcaggtcactctaggcacataaagaaaacataactaaccaag ctgcagccgagacagtgaagaaccgttaaacggttgtttaaataaactgaattatt tagagtcatttcttggtaggaagtagcattggcacgtaaaggagcccaagcaatctgt ggaaagcccaggctgggagccagcagtttgcacccctctggcgtgtacctaagg gtttcttaattgtgtgtttctaaatctccagaggggttctcattcacttccactcgggtc acaatacttggagcggatttactgtcttagcatctatcgggtggccctcgattgaggctg aacctgagcccacttctcagctgttaaggagagcacaagcaccagaagaggctga cccggcagacctgtggcatttttaacaaggcctcctgggtctgtgggagggaggct tacataaggtgcaaattagaaataataataaagcccatatcaattgtcatctttttaag ctcaagtttgaagaccccactgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccatttgg caaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaacag agagacagcagaatatggccaacaggatactgtgtaagcagttcctgccccct cagggccaagaacagttggaacaggagaatatggccaacaggatactgtggttaa	编码 CD19 CAR2-63 的逆转录病毒载体的 DNA 序列

[0139]

SEQ ID NO:	序列	描述
	gcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatgggccagatgcgggtcccgc ctcagcagttctagagaacctcagatgttccagggtgcccccaaggacctgaaatga ccctgtgccttattgaactaaccaatcagttcgtctcgtctctgtcgcgcgtctgt ccccgagctcaataaaagagcccacaaccctcactcggcgcgccagtcctccgata gactgcgtgccccgggtaccgtattccaataaaacctctgtctgttgcacccgaatc gtggactcgtgatcctgggagggtcctcagattgattgactgccacctcggggg tctttcattggagggtccaccgagattggagacctcggccaggaccaccgacccc cccgccccgggagtaagctggccagcaactatctgtctgtcctgattgtctagtcta tgactgattttatgcgctcgtcgtactagttagtaactagctctgtatctggcggac ccgtgggtggaactgacgagttcggaacaccggccgcaacctgggagacgtcca gggactcggggccgtttttgtggcccacctgagtcctaaatcccgatcgttagg acttttggtgcacccccttagaggaggatgtggtctggtaggagacgagaacc taaaacagttcccgctcgtctgaattttgcttccggttgggaccgaagccgcgcc cgcgtctgtctcgtcagcatcgttctgtgtctctgtctgactgtttctgtattgtct gaaaatatggcccgggctagactgtaccactccctaaagttgaccttaggtcactgg aaagatgtcagcggatcgtcacaaccagtcggtagatgcaagaagacggtgg gttacctctgtctcagaaatggccaaccttaacgtcggatggccgcgagacggcac cttaaccgagacctcatcaccagggtlaagatcaaggcttttcacctggcccgcaltgg acaccagaccaggtcacctacatcgtgacctgggaagccctggcctttlgacccccctc cctgggtcaagccctttgtacaccctaagcctccgctcctcttctcctcatccgccccgt ctctccccctgaacctcctcgttcgaccccgcctcgtatcctccctttatccagccctcac tcctctctaggcggccccataggccatagagatcttatatggggcacccccggccct tgtaaactccctgacctgacatgacaagagttaactaacagccctctccaagctca cttaacagctctctactitagtccagcacgaagtctggagacctctggcggcagccctacc aagaacaactggaccgaccgggtgtacctcaccttaccgagtcggcgacacagtgt gggctccgcgacaccagactaagaacctagaacctcgtggaaggaccttacacag tcctgctgaccacccccaccgcccctaaagtagacggcatcgcagcttggatacacgc cgcccactgaaggctcggaccccgggggtggacctcctctagactgctcgcga ggatccctcagggccgcccaccATGGAGTGGTCCTGGGTGTTCT GTTTTTCTGAGCGTCACAACCGGTGTGCATAGTGAT ATTGAGCAGAAGCTGATTAGCGAAGAGGACCTGGAT ATCCAGATGACACAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCC AGCCTGGGCGACCGAGTGA CTATCAGCTGCCGGGCA TCCCAGGATATTTCTAAGTATCTGAACTGGTACCAGC AGAAGCCCGACGGCACTGTCAAACCTGCTGATCTACC ACACCAGTAGACTGCATTCAGGGGTGCCTAGCAGGT TCTCCGGATCTGGCAGTGGGACTGACTACTCCCTGAC CATCTCTAACCTGGAGCAGGAAGATATTGCCACCTAT TTCTGCCAGCAGGGCAATACACTGCCTTACACTTTTG GCGGGGGAACAAAGCTGGAGATCACTGGCGGAGGA GGATCTGGAGGAGGAGGAAGTGGAGGAGGAGGATC AGAGGTGAAACTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGG TCGCACCTTCACAGAGCCTGTCCGTGACATGTACTGT CTCCGGAGTGTCTCTGCCCGATTACGGCGTCTCTTGG ATCCGGCAGCCCCCTAGAAAGGGACTGGAGTGGCTG GCGGTGATCTGGGGAAGTGAACCTACTATAATA GTGCTCTGAAATCAAGACTGACCATCATTAAAGGACAA CTCTAAAAGTCAGGTGTTTCTGAAGATGAATCCCTG	

[0140]

SEQ ID NO:	序列	描述
	<p>CAGACCGACGATACAGCAATCTACTATTGCGCCAAAC  ACTACTATTACGGCGGGAGCTATGCCATGGATTACTG  GGGGCAGGGAACCTCCGTCACCGTGAGCAGCgcTAA  GCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACC  GGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC  CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGGCGCAGT  GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCTAGGAAAAT  TGAAGTTATGTATCCTCCTTACCTAGACAATGAGA  AGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAAC  ACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAA  GCCCTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTG  GCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT  TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCA  CAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCGCCCCGG  GCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCA  CGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCA  GCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCC  AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAA  GAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCC  GGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAG  AACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAA  GATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG  AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG  CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC  CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC  TAAcagccaggggcccgaaggcggaattcggcgccgatcatagggc  tccggattagccaatttgtaagacaggatcatcagtggtccaggctctagtttgactc  aacaatatcaccagctgaagcctatagagtacgagccatagataaaataaaagatttat  ttagtctcagaaaaaggggggaatgaaagacccacctgtaggtttggcaagctagc  ttaaagtaacgccattttgcaaggcatgaaaatacataactgagaatagagaaggtcag  atcaaggtttagaacagagagacagcagaatatgggccaacaggatctgtggtgta  agcagttcctgccccgctcaggccaagaacagttggaacaggagaatatgggcca  acaggatctgtggtgtaagcagttcctgccccggctcaggccaagaacagatggctc  ccagatgcggtcccgcctcagcagttctagagaaccatecagatgttccagggtgcc  ccaaggacctgaaatgacctgtgccttattgactaaccaatcagttcgttctcgtt  ctgltcgcgccttctgctccccgagctcaataaaaagagcccacaacccctcactcggc  gcgccagtctccgatalagactgcgtcggcggtlaccgtgttcaataaacctctt  gcagttgcatccgactcgtggtctcgtgttcttggagggtctcctctgagtgattgac  taccgctcagcggggtcttcagttctccacctacacaggtctcactaacattcctgat  gtgccgagggactccgctcagcccgggtttgtttataataaaatgcaagaacagtgctc  cctcaagccagactacatcctgactcggctttataaaaagaatgftgaagggtctctg  gactatctgccacacgacttttaagattttatgctcctggatgaggatftagcaatct  atcctcgtctatlttgctggtctcctgattttaaattctagttgactcccttctgagag  cagggcagttgcagagtagtaatactctgagggcaggcttctgtgaaaaggtgcctg  ggctcagtgtagattttgccataaaaaggggtcctgccctgtgtacagacagatcgg  aatctagagtgatactcagagtcgccggttccggggtctgatctcaggcatcttt  gcltagagatcctctacgccgacgcatcgtggccgggtaccgagctcgaattcglaa  tcatggtcatagctgttctgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacg</p>	

[0141]

SEQ ID NO:	序列	描述
	agccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaagtgtgagtaactcacatta attgcgtgcgctactgcccgtttccagtcgggaaacctgfcgtccagctgcattaa tgaatcggccaacgcgcggggagaggcggfttgcgtattggcgctcttccgcttct cgtcactgactcgtcgcctcggctgtcggctgcggcgagcggtatcagctcactc aaaggcggtaatacggftatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtg agcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgctgtgctggcgtttt ccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagagggtg gcgaaaccgacaggactataaagataaccaggcgttccccctggaagctccctcgtg cgctcctgttccgacctgccgttaccggatactgtccgctttctccctcgggaa gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcggtgtaggctgtcgtc caagctgggctgtgtgcacgaacccccgtcagccgaccgctcgccttatccggt aactatcgtcttgagccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagcca ctgtaaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgtctacagagttctgaagtg gtggcctaactacggctacactagaaggacagtattggatctgcgctcgtggaagc cagttacctcggaaaaagagttgtagctctgatccggcaaaaaaccaccgctggt agcggtgggtttttgttcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaaga agatccttgatctttctacggggctgacgctcagtggaacgaaactcacgtaagg gatfttggctcatgagattatcaaaaaggatctcacctagatcctttaaattaaaaatgaa gttttaaataaatcaaaagtataatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgctaatca gtgaggcacctatctcagcgatctgtctattcgttcatccatagttgctgactccccgtc gtgtagataactacgatacgggagggctaccatctgccccagtgctgcaatgatacc gcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaacagccagccggaag ggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagcttattaattgtg ccgggaagctagagtaagtagttcggcagttaatagtttgcgcaacgtgtgcaattgc tacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcttggatggctcattcagctccggttccaa cgatcaaggcaggttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggttagctcctcgggt cctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgaggttatcactcatggttatggcagca ctgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactca accaagtattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttccccggcgtcaat acgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacggt ctctggggcgaaaactcgaaggatctaccgctgtgagatccagttcgatgtaaccga ctctgtcaccgaactgatctcagcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaa acaggaaaggcaaaatgcccaaaaagggaataaggcgcacacggaaatgttgaat actcatactcttctttcaataatttgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggat acatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataagggttccgcgcacattccccgaaa agtggcacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgt atcacgaggcccttctcgtcgcgcgttccggtgatgacgggtgaaaacctctgacacat gcagctccccggagacgggtcacagcttctgtgtaagcggatgccgggagcagacaag cccgtcaggggcgctcagcgggtgtggcgggtgtcggggctggcttaactatcggg catcagagcagattgactgagagtgaccatagcgggtgtgaaataaccgcacagatg cgtaaaggagaaaataaccgatcaggcgccattcgcattcaggctgcgcaactgttgg gaagggcagtcgggtcggggcctcttctgctattacgccagctggcgaagggggatgt gctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgaaaac gacggccagtgcc	
22	EVKQLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP RKGLEWLGVIWGSETTYYNLSALKSRLTIKDNSKSKVFLKM NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	CD19 scFv V <sub>H</sub> -(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> -V <sub>L</sub>

SEQ ID NO:	序列	描述
	GGGGSGGGSGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	
23	DIEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR	CD19 CAR2-63 (成熟多肽, 无信号肽)
24	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR	CD19 CAR2-63a(具有信号肽的前体)
25	ATGGAATGGTCATGGGTCTTTCTCTTTTTTCTCAGCGTGACCACCGAGTCCACTCCGATATCCAGATGACACAGACCACCA GCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGAGTGACTATCAGC TGCCGGGCATCCCAGGATATTTCTAAGTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACTGTCAAAGTCTGATCTACCACACCAGTAGACTGCATTCAGGGGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGATCTGGCAGTGGGACTGACTACTCCCTGACCATCTCTAACCTGGAGCAGGAAGATATTGCCACCTATTTCTGCCAGCAGGGCAATACACTGCCTTACACTTTTGGCGGGGAACAAAGCTGGAGATCACTGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGAAGTGGAGGAGGAGGATCAGAGGTGAAACTGCAGGAAAGCGGACCAGACTGGTGCACCTTCACAGAGCCTGTCCGTGACATGTACTGTCTCCGAGTGTCTCTGCCGATTACGGCGTCTCTTGGATCCGGCAGCCCCCTAGAAAGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGA TCTGGGGAAGTGAAGTAACTACTATAATAGTGCTCTGAAATCAAGACTGACCATCATTAAGGACAACCTCTAAAAGTCAGGTGTTTCTGAAGATGAATTCCTGCAGACCGACGATACAGCAATCTACTATTGCGCCAAACTACTATTACGGCGGGAGCTAT	编码 CD19 CAR2-63a 的 DNA 序列

[0142]

SEQ ID NO:	序列	描述
	<p>GCCATGGATTACTGGGGGCAGGGAACCTCCGTCACCGTGAG  CAGCgcTAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA  CACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC  CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACAC  GAGGGGGCTGGACTTCGCCCCCTAGGAAAATTGAAGTTATGT  ATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACC  ATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCT  ATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGG  TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG  GCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCT  CCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCG  GGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGC  GACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG  CGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCT  ATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT  TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAA  GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC  TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGG  ATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT  TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG  CCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAA</p>	
[0143]	<p>26 aagcttgcctgcaggtcgactctaggcacataaagaaaacataactaaccaag  ctgcagccgagacagtgaaaagaaccgtaaaacggttgttttaataaactgaattatt  tagagtcatttcttggtaggaagtagcattggcacgtaaaaggagcccaaagcaatctgt  ggaaagcccaggctgggagcccagcagtttgcacccccctctggcgtgtacctaagg  gfttctaattgtgtgttctaaatctccagaggggttctcattcacttccactcgggtc  acaacttggacgcggatttactgtcttagcatctatcggtggccctcgattgaggctg  aacctgagggccacttctcagcttgttaaggagagcacaagcaccagaagaggctga  cccggcagacctgtgggcatttttaacaaggccctcctgggtctgtgggaggcaggct  tacataaggtgcaaattagaaatataataataagcccatatcaatttgcaccttttttaag  ctcaagtttgaagaccccactgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttg  caaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaacag  agagacagcagaatattggccaacaggatatctgtgtaagcagttcctgccccgct  cagggccaagaacagttggaacaggagaatattggccaacaggatattctgtgta  gcagttcctgccccgctcaggccaagaacagatgggtcccagatgcggtcccgc  ctcagcagttctagagaaccatcagatgttccaggggtcccgaaggacctgaaatga  ccctgtgccttattgaactaaccaatcagttcgttctcgttctgttcgctcgttctgt  ccccgagctcaataaaagagcccacaaccctcactcggcgcgccagtcctccgata  gactgcgtcggccgggtaccctattccaataaagcctctgtgttgcacccaatc  gtggactcgtgatccttgggaggtctcctcagattgattgactgccacctcggggg  tccttcaattggagggtccaccgagattggagaccctgcccaggaccaccgacccc  cccgggggaggttaagctggccagcaactatctgtctgtcagattgtctagtctta  tgactgattttatgcctcgtcgtcgtactgttagctaaactagctctgtatctggcgac  ccgtggtggaactgacgagttcggaacaccggccgcaaccctgggagacgtccca  gggactcgggggcccgttttggggccgacctgagtcctaaatcccgatcgtttagg  actcttgggtgaccccccttagaggaggatgtggtctggtaggagacgagaacc  taaacagttcccgcctccgtctgaattttgcttccggttggaccgaagccgccc  cgctctgtctgctgcagcatcgttctgtgtctctgtctgactgttctgtatttctct</p>	<p>编码 CD19 CAR2-63a  的逆转录病毒载体的  DNA 序列（从起始密  码子到终止密码子）</p>

[0144]

SEQ ID NO:	序列	描述
	<p>gaaaatatgggcccgggctagactgttaccactcccttaagttgaccttaggtcactgg  aaagatgtcgagcggatcgctcacaaccagtcggtagatgtcaagaagagacgtgg  gttacctctgctctgcagaatggccaaccttaacgtcggatggccgcgagacggcac  cttaaccgagacctatcaccaggtaagatcaaggcttttaccctggcccgcacatgg  acaccagaccaggctcccctacatcgtgacctgggaagccttggctttgacccccctc  cctgggtaagcccttgtacacctaagcctccgctcctcttctccatccgccccgt  ctctcccccttgaacctcctcgttcgacccccctcgtatcctccctttatccagcctcac  tccttcttaggcgcccccatatggccatagagatcttatatggggcaccgccccct  tgtaaacttccctgacctgacatgacaagagtactaacagccccctctccaagctca  cttaacagctctctactagtcagcagcaagctctggagacctctggcggcagcctacc  aagaacaactggaccgaccggtgtacctaccctaccgagtcggcgacacagctgt  gggtccgccgacaccagactaagaacctgaacctcgtggaagaccttacacag  tctgtgaccacccccaccgccctcaagtagacggcatcgacgttggatacacgc  cgcccacgtgaaggctcgcgacccccgggggtggaccatcctctagactgcctcgcga  ggatccCTCGAGGCCGCCACCATGGAATGGTCATGGGTC  TTTCTCTTTTTTCTCAGCGTGACCACCGGAGTCCACT  CCGATATCCAGATGACACAGACCACCAGCAGCCTGA  GCGCCAGCCTGGGGCAGCGAGTGACTATCAGCTGCC  GGGCATCCCAGGATATTTCTAAGTATCTGAACTGGTAC  CAGCAGAAGCCCAGCGGCACTGTCAAAGTGTGATC  TACCACACCAGTAGACTGCATTCAGGGGTGCCTAGCA  GGTTCTCCGGATCTGGCAGTGGGACTGACTACTCCCT  GACCATCTCTAACCTGGAGCAGGAAGATATTGCCACC  TATTTCTGCCAGCAGGGCAATACACTGCCTTACACTT  TTGGCGGGGGAACAAAGCTGGAGATCACTGGCGGAG  GAGGATCTGGAGGAGGAGGAAGTGGAGGAGGAGGA  TCAGAGGTGAAACTGCAGGAAAGCGGACCAGGACT  GGTCGCACCTTCACAGAGCCTGTCCGTGACATGACT  GTCTCCGGAGTGTCTCTGCCCGATTACGGCGTCTCTT  GGATCCGGCAGCCCCCTAGAAAGGGACTGGAGTGGC  TGGGCGTGATCTGGGGAAGTGAAACTACCTACTATAA  TAGTGCTCTGAAATCAAGACTGACCATCATTAAGGAC  AACTCTAAAAGTCAGGTGTTTCTGAAGATGAATTCCC  TGCAGACCGACGATACAGCAATCTACTATTGCGCAA  ACACTACTATTACGGCGGGAGCTATGCCATGGATTACT  GGGGGCAGGGAACCTTCCGTCACCGTGAGCAGCgcTA  AGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACAC  CGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCG  CCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAG  TGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCCTAGGAAAA  TTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAG  AAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAA  CACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAA  GCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTG  GCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT  TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCA  CAGTGACTIONACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGG  GCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCA</p>	

[0145]

SEQ ID NO:	序列	描述
	CGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCA GCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAA GAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCC GGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAG AACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAA GATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC CTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC TAACAGCCAGGGGCCGCCAAGGGCGAATTCGCggcc gcatcgatcataggcctccggattagccaattgtaaagacaggatcatcagtggtcc aggcctagtttgactcaacaatatcaccagctgaagcctatagtagcagccataga taaataaaagattttatagctccagaaaaagggggaatgaaagacccacctgta gtttgcaagctagcctaagtaacgccatttgcaggcatggaaaatacataactgag aatagagaagttcagatcaaggttaggaacagagagacagcagaatatggccaac aggatctgtgtaagcagttcctgccccgctcaggccaagaacagttggaacagg agaatatggccaacaggatctgtgtaagcagttcctgccccgctcaggcca agaacagatggtccccagatcggtccccctcagcagttctagagaacctcaga ttttccagggtgccccaggacctgaaatgacctgtgcctatttgaactaaccaatc agttcgcttctcgttctgttcgctcgttctgctccccgagctcaataaaagagcccac aacctcactcggcgcgccagctcctccgatagactgcgtcggcggtaccctgtt ctcaataaacctctgcagttgcatccgactcgtggtctcgtgttctgggagggtct cctctgagtgattgactaccctcagcggggtctttagtttctccacctacacaggct cactaacattcctgatgtgcccagggactccgtcagcccgtttttgttataataaaat gcaagaacagtggtccctcaagccagaactacatcctgactcctggctttataaaagaat gttgaagggtcctgtggactatctccacacgacttttaagattttatgcctcctggatg agggatttagtaactatcctcgtctatttgcgtgcttctccgtattttaaattctagttgc actcccttctgagagcagggcattgcagagtagtaatactctagggcagggctct gtgaaaaggtgcctgggctcagtgtagattttgccataaaaaggggtcctgcccctg gtacagacagatcggaatctagagtgatactcagagtcctccgggtccggggctct gatctcagggcatcttgcctagagatcctctacgccggacgcatcgtggccggglacc gagctcgaattcgaatcatggtcagctgttctcgtgtgaaattgtatccgctcaaa ttccacacaacatacagcgggaagcataaagtgtaaagcctgggggtcctaataagat gagtaactcacaatattgcgttgcgtcactgcccgttccagtcgggaaacctgtc gtgccagctgcaatgaatcggccaacgcgggggagagggcgttgcgtattgg gcgcttccgcttctcgtcactgactcgtcgtcggctcgtcggctcggcggag cggatcagctcactcaaaaggcgtataacggttatccacagaatcaggggataacgc aggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcc gcgttgcgtggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaatcagc ctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgttccccct ggaagctccctcgtgcgtcctcgttccgacctgccgttaccggatacctgtccgc ctttccctcgggaagcgtggcgttctctatagctcagctgtaggtatctcagttcg gtgtaggtcgtcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgacc gctgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaaagacacgacttatcgc cactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagggtatgtagcgggtgcta cagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagatttggatct cgctctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaa	

SEQ ID NO:	序列	描述
[0146]	<pre> caaaccaccgctgtagcgggtggttttttgttgaagcagcagattacgcgcagaaa aaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacga aaactcacgtaagggaftttggfcatgagattatcaaaaaggatctcacctagatcctt taaattaaaaatgaagtttaaatcaatcaatcaagatataatgagtaaaactggctgacagtt accaatgcttaatcagtgaggcacclatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagtt gcctgactccccgctgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggcccca gtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaa ccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctctgaactttatcgctccat ccagctatfaattgtccgggaagctagagtaagtagtccagttaatagtttgcgc aacgtgttgccattgctacaggcatcgtggtgacgctcgtcttggatggctcatt cagctccggttccaacgatcaaggcagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaag cggtagctcctcggctcctccgatctgtcagaagtaagttggccgagtggtatcact catggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgt gactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgct cttccccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttaaaaatgctc atcattgaaaacgttctcggggcgaactctcaaggatctaccgctgttgagatcc agttcgatgaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttactttaccagcgt ttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgca cacggaatgtgaatactatactctctcttttcaatattatgaagcattatcagggtta ttgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaatagggttccg cgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaccattattatcatgacatta acclataaaaataggcgtatcacgaggcccttctgctcgcgcgttccggtgatgacggt gaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttctctgaagcggatg ccgggagcagacaagcccgcaggcgcgctcagcgggtgttggcgggtgctgggg ctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgccacatagcgggtg aaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgcattcgcattcag gctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcggggcctctcgtattacgccagctg gcaaaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaaccaggggtttccag cacgaggtgtaaaacgacggccagtgcc                     </pre>	
27	<pre> DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQED IATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGSGGGGSE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR KGLEWLVGIWGETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMN SLQTDATAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSAKPT TTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF APRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPS KPFWVWLVVGGVVLACYSLLVTVAFI I FWVRSKRSLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRRGKGDGLYQGLS TATKDITYDALHMQUALPPR                     </pre>	CD19 CAR2-63a(成熟多肽, 无信号肽)

[0147] 实例2:用抗CD19 CAR构建体转导从PBMC和脐带血中分离的T细胞将编码侧接5’和3’逆转录病毒LTR(图2;SEQ ID NO:16)的SEQ ID NO:14的CD19CAR2-63 CAR的γ逆转录病毒载体在用针对人CD3的抗体激活细胞持续48-72小时之后,通过逆转录病毒转导引入到T细胞中。

[0148] 通过在37℃水浴中解冻先前冷冻的正常健康供体外周血单核细胞(PBMC)或脐带血(CB)细胞,并且然后将解冻的细胞稀释到补充有10% FBS和300u/ml IL-2的10ml AIM-V生长培养基(吉博科公司-马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司(GIBCO-Thermo Fisher scientific,Waltham,MA))中来制备从PBMC或脐带血中分离的激活的人类T细胞。

将细胞转移到T25培养瓶中,向所述培养瓶中添加50ng/ml小鼠抗人CD3抗体OKT3(新泽西州拉里坦的奥思生物技术公司(Orth Biotech,Rartian,NJ))。将细胞在37℃下温育两天。

[0149] 将由已经用包含CD19 CAR构建体(SEQ ID NO:16)的逆转录病毒载体转染的PG13包装细胞产生的冷冻逆转录病毒上清液在37℃水浴中解冻。将激活的PBMC或脐带血激活的T细胞离心(1500rpm,5分钟)并重悬于添加了IL-2(1000u/ml)的PG13包装细胞(1.5ml/孔,总共2孔)的逆转录病毒上清液中,然后转移至已包被有纤维连接蛋白(在PBS中10μg/ml)的12孔板的孔中(2孔,2×10<sup>6</sup>个细胞/孔)。将板制成石蜡膜,并且在室温下以2,500rpm离心1小时,并且然后在37℃下再温育另外3小时。重复转导过程(将板离心,去除上清液,并且将细胞重悬于新鲜包装细胞病毒上清液中,并且在室温下离心1小时)。将两次转导的细胞在37℃下温育1小时,之后将补充有FBS和CD3抗体的另外1ml培养基添加到每个孔中,并且将细胞在37℃下温育3至4天。

[0150] 实例3:CD19 CAR转导的T细胞的流式细胞术分析

[0151] 为了检测从PBMC和CB分离中的经转导的T细胞的细胞表面上的CD19的表达,进行了流式细胞术测定。为了检测T细胞受体,将10<sup>6</sup>个细胞以1500rpm离心5分钟,然后将细胞重悬于50μl CD19-Fc蛋白中至浓度为8μg/ml。将细胞加CD19蛋白在室温下温育1小时,之后添加1ml PBS作为洗涤液,并且将细胞以1500rpm离心5分钟,并以2μg/ml重悬于APC抗人IgG Fcγ中。将细胞用1ml PBS洗涤(以1500rpm离心5分钟)并且重悬于FACS染色缓冲液中。将样品在Intellicyte流式细胞仪上分析。

[0152] 图3A-C示出了第一次转导实验的流式细胞术结果,其中将来自PBMC和CB细胞两者的激活T细胞用CD19 CAR2-63逆转录病毒转导。未用CD19 CAR2-63逆转录病毒转导的激活T细胞不表达CD19 CAR(图3A)。大约62.6%的CD19 CAR2-63转导的PBMC源性T细胞表达抗CD19抗体(图3B),并且55.4%的CB源性T细胞(图3C)对抗CD19抗体呈阳性。图4A-D示出了第二次独立转导实验的流式细胞术结果,其中将来自PBMC和CB细胞两者的激活T细胞用CD19 CAR2-63逆转录病毒转导。在此实验中,从PBMC(图4A)或脐带血(图4C)中分离的未经转导的激活T细胞不表达CD19 CAR,而54%的CD19 CAR2-63转导的PBMC源性T细胞(图4B)和43%的CD19 CAR2-63转导的CB源性T细胞(图4C)表达CD19 CAR。

[0153] 实例4:CD19 CAR转导的T细胞的激活测定

[0154] 来自CB和PBMC的未经转导的对照T细胞和来自CB和PBMC的抗CD19 CAR2-63转导的T细胞在微量滴定板中分别用K562细胞、用CD19基因转染的K562细胞或正常表达CD19的Raji肿瘤细胞刺激。对于细胞因子产生测定,将1×10<sup>5</sup>个细胞/孔的未经转导的对照T细胞或CAR2-抗CD19 CAR转导的T细胞与1×10<sup>5</sup>个细胞/孔的K562细胞、表达CD19的K562细胞或Raji肿瘤细胞在生长培养基中混合。在培养24小时之后,采集培养物上清液,并且用来自e生物科学公司(eBioscience)(加利福尼亚州圣地亚哥)的ELISA测定试剂盒测量IFN $\gamma$ 、IL-2和TNF $\alpha$ 。所有实验一式三份地进行。

[0155] 图5示出了,当与K562细胞一起培养时,从PBMC中分离的未经转导的T细胞释放少于2000pg/ml IFN $\gamma$ ,无论K562细胞是否表达CD19。CB源性未经转导的T细胞仅在与Raji细胞共培养时产生适量的IFN $\gamma$ 。相比之下,当与表达CD19的细胞(表达CD19转基因的K562细胞或Raji细胞)共培养时,用编码CD19 CAR2-63的构建体转导的PBMC源性和CB源性T细胞都显著增加了IFN $\gamma$ 的产生。当与CD19+细胞共培养时,经转导的PBMC源性T细胞产生的IFN $\gamma$ 量是未

经转导的PBMC源性T细胞产生的量的超过8倍。当与不表达CD19的细胞共培养时,用CD19 CAR转导的CB源性T细胞产生的IFN $\gamma$ 是未经转导的CB T细胞的超过三倍。当与CD19+细胞-CB源性细胞共培养时,两种类型的T细胞(PBMC源性和脐带血源性)比当与CD19-细胞共培养时产生更多的IFN $\gamma$ 。例如,当与CD19+细胞共培养时,CD19 CAR2-63转导的CB T细胞产生至少2.5倍的IFN $\gamma$ ,并且当与CD19+细胞共培养时,CD19 CAR2-63转导的PBMC T细胞产生近10倍的IFN $\gamma$ 。

[0156] 图6示出了当与表达CD19的K562细胞共培养时,源自表达CD19 CAR2-63的PBMC或CB的T细胞(但不是任一来源的未经转导的T细胞)产生的IL-2释放了大量的IL-2。图7示出了,当与表达CD-19的K562细胞和(CD19+)Raji细胞共培养时,表达CD19CAR2-63的CB和PBMC T细胞释放TNF $\alpha$ ,但与不表达CD19的K562细胞共培养时不释放。非CAR转导的CB和PBMC T细胞仅在与Raji细胞共培养时产生非常少的TNF $\alpha$ 。

[0157] 实例5:使用CD19 CAR转导的T细胞进行的细胞毒性测定

[0158] 还评估了CAR2-抗CD19 CAR-T细胞的细胞毒性。一种用于测量细胞毒性的测定是DELFI A细胞毒性测定(马萨诸塞州沃尔瑟姆的珀金埃尔默公司(PerkinElmer,Waltham,MA))。在此测定中,靶细胞(例如,肿瘤细胞)首先在37°C下装载有荧光增强配体,持续25分钟,K562细胞的 $2.5 \times 10^3$ 个细胞/孔或 $5 \times 10^3$ 个细胞/孔。然后将Raji肿瘤细胞与未经转导的对照或经转导的T细胞以不同的效应物:靶标(E:T)比率混合,并温育2小时。采集20 $\mu$ l/孔上清液,并通过添加钆溶液形成荧光螯合物来分析释放的配体。时间分辨荧光(TRF)可以在具有TRF能力的读板仪Cytation 5(佛蒙特州威努斯基的伯腾公司(BioTek instruments,Winooski,VT))上测量。细胞毒性可以通过以下公式计算:特异性溶解%=(实验-自发)/(最大-自发)\*100。

[0159] 图8示出了,当使用PBMC或CB源性表达CD19 CAR的T细胞作为针对表达CD19的K562细胞的效应细胞进行细胞毒性测定时,随着效应物:靶标比率从0.1:1增加到0.33:1,细胞毒性水平%稳步增加,并且在效应物:靶标比率为1:1时达到97%的峰值。当效应细胞是未经转导的CB源性或PBMC源性T细胞时,PBMC源性T细胞表现出比CB源性T细胞更高的细胞毒性%,但是细胞毒性%在3:1 3:1效应物:靶标比率下仅达到49.5%(对于作为效应细胞的CB源性T细胞为28%)。

[0160] 图9示出了,当使用PBMC或CB源性表达CD19 CAR的T细胞作为针对天然表达CD19的Raji细胞的效应细胞进行细胞毒性测定时,随着效应物:靶标的比率从0.1:1增加到1:1,细胞毒性水平%稳步增加,此时细胞毒性开始稳定在大于95%。然而,当效应细胞是未经转导的CB源性或PBMC源性T细胞时,细胞毒性在1:1比率下仅达到约39%,并且在3:1比率下仅略微上升至约44%。

[0161] 实例6.gdT细胞的分离

[0162] 对于一些实验,从外周血单核细胞(PBMC)中分离 $\gamma\delta$ T细胞(gdT细胞)。可以使用Stemcell Technologies人 $\gamma/\delta$ T细胞分离试剂盒(华盛顿州西雅图的干细胞技术公司(Stemcell Technologies,Seattle,WA))进行 $\gamma\delta$ T细胞分离。

[0163] 在一个方案中,将新鲜解冻的PBMC悬浮液悬浮在30mL含有25%胎牛血清(FBS)的杜尔贝氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS)中。(将PBMC从通过HemaCare订购的白细胞中分离,并在小瓶中以每ml  $1 \times 10^8$ 个细胞的浓度冷冻。对于gdT细胞分离,可以在单个50mL离心管中将十

个小瓶解冻到含有25% FBS的30mL DPBS培养基中,从而每50mL离心管产生大约 $8 \times 10^8$ - $1 \times 10^9$ 个细胞。)将PBMC通过40 $\mu$ m细胞过滤器,并确定细胞数量。可以保留大约 $3 \times 10^5$ 个细胞用于流式细胞术,并且其余的通过离心采集。去除上清液,并且将细胞沉淀物重悬于50mL管中每 $10^7$ 个细胞60 $\mu$ L MACS分离缓冲液(加利福尼亚州圣地亚哥的美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech, San Diego, CA))中,其中每 $10^7$ 个细胞添加20 $\mu$ L FcR封闭剂。细胞在室温下与封闭试剂一起温育5分钟,之后每 $5 \times 10^7$ 个细胞添加12.5 $\mu$ L EasySep™人 $\gamma/\delta$ T细胞分离混合物(华盛顿州西雅图的干细胞技术公司)。简单混合之后,细胞在室温下再温育另外15分钟,同时在板振荡器上混合。然后通过每 $10^7$ 个细胞添加1-2mL缓冲液并以1400rpm离心5分钟来洗涤细胞以去除未经结合的初级抗体。将上清液吸出,并将细胞沉淀物重悬于MACS分离缓冲液(每 $10^7$ 个细胞80 $\mu$ L)中。

[0164] 对于pan细胞耗竭,将磁性颗粒(抗生物素微珠,美天旎生物技术公司)涡旋,然后每 $5 \times 10^7$ 个细胞取出12.5 $\mu$ L悬浮的珠粒,并将其添加到悬浮细胞制剂中。细胞和磁珠在室温下在不振荡的情况下温育10分钟,然后添加另外的MACS分离缓冲液,使体积达到25mL(如果原始体积小于10mL)或50mL(如果原始体积大于10mL)。轻轻上下吸取细胞2-3次以混合,并且将试管(无盖)放置于磁架(MACS柱分离器,美天旎生物技术公司)中,在RT下持续10分钟。将富集的细胞悬浮液小心地吸取到新的50mL试管中。将细胞以1400rpm离心5分钟,之后去除上清液。然后将细胞以大约 $10^7$ 个细胞/mL重悬于MACS分离缓冲液中。

[0165] 将每 $10^7$ 个细胞的2.5 $\mu$ L抗TCR $\alpha/\beta$ -生物素人抗体(美天旎生物技术公司)添加到耗竭了pan细胞的细胞中,并且用移液管吸头将抗体和细胞混合,并且然后在4℃黑暗中温育10分钟。然后通过添加13mL MACS分离缓冲液洗涤细胞,将悬浮的细胞转移到15mL管中,以1400rpm离心5分钟,并吸出上清液。重复洗涤,并将最终沉淀物重悬于每 $10^7$ 个细胞97.5 $\mu$ L MACS分离缓冲液中,并且然后向细胞中添加2.5 $\mu$ L/ $10^7$ 个细胞的抗生物素微珠。将悬浮液用移液管移几次以混合,用移液管吸头混合,并在4℃的黑暗中温育15分钟。

[0166] 然后通过添加13mL缓冲液洗涤细胞,并以1400rpm将样品离心5分钟。将上清液完全吸出,并将细胞重悬于至多500 $\mu$ L MACS分离缓冲液/ $10^8$ 个细胞中。

[0167] 对于耗竭 $\alpha/\beta$ T细胞,将LD柱(美天旎生物技术公司)用2mL MACS分离缓冲液冲洗,并将细胞悬浮液施加到柱。收集未经标记的细胞的流通液,并且每次将柱用1mL缓冲液洗涤5次。将洗涤液添加流通液中,并确定细胞数量。取出 $3 \times 10^5$ 个细胞的等分试样用于流式细胞术以评估细胞纯度。将剩余的细胞离心并重悬于T细胞培养基中至每mL  $2 \times 10^6$ 个细胞的浓度,并分配到6孔培养板的孔中。

[0168] 对于T细胞的扩增,将T细胞TransAct溶液(美天旎生物技术公司,每 $10^6$ 个细胞5 $\mu$ L)添加到T细胞培养基中的细胞中,所述细胞培养基例如T细胞OpTmizer™CTS™培养基(飞世尔科技公司),其被修改为包含1%谷氨酰胺、5%人血清、26ml OpTmizer™T细胞扩增补充剂、1:1000庆大霉素和300U IL-2。将板放置在细胞温育箱中持续2-3天。然后将培养基换成没有添加T细胞TransAct溶液的新鲜T细胞培养基(美天旎生物技术公司)。

[0169] 在第9天,在T细胞生长的指数期期间,将gdT细胞转移到合适的组织培养袋中。将细胞维持在 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/ml的密度。在第13天,在重悬之后对细胞进行计数,并将细胞转移到组织培养袋中,以保持细胞密度为 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/ml。在第16天,再次对细胞进行计数,并且此后在组织培养袋中含有300U/ml rIL-2的培养基中,细胞密度维持在 $1 \times 10^6$ 个

细胞/ml。在第20天,对细胞进行计数并冷冻。

[0170] 实例7: NSG小鼠的Raji异种移植物的处理

[0171] 对于体内研究,基本上如实例2所描述,基本上如所描述从PBMC中分离T细胞,并用来自培养的PG13包装细胞的病毒上清液进行转导,所述包装细胞已经用图2 (SEQ ID NO: 16)所描绘的编码CD19 CAR2-63 (SEQ ID NO: 14)的构建体转染,除了细胞在转导前用CD3抗体(50ng/ml的OKT3)激活持续三天,并且通过在37°C下将孔中包含T细胞加病毒上清液的六孔板离心一小时来进行转导,之后将所述板在37°C下温育1小时,并且然后添加另外3ml培养基并将所述板温育过夜。第二天重复转导过程,并且然后在通过流式细胞术分析之前,将细胞在组织培养瓶中于37°C下温育三天。

[0172] 另外,在一些实验中,用CD19 CAR2-63构建体转导分离的 $\gamma\delta$ T细胞(gdT细胞),用于体内实验。使用阴性选择试剂盒进行pan细胞耗竭并且通过 $\alpha\beta$ 抗体进行 $\alpha\beta$ T细胞耗竭,从PBMC中分离gd T细胞。通过FACS评估 $\gamma\delta$ T细胞的纯度和细胞数量。

[0173] 用来自MACS的可溶性CD3/CD28抗体激活分离的 $\gamma\delta$ T细胞,持续72小时,并且然后用由已经用编码CD19 CAR2-63的逆转录病毒载体包装的PG13细胞产生的逆转录病毒上清液转导。转导过程连续进行两次。转导之后4天,通过流式细胞术检测转导效率。计算总CAR+T细胞的百分比。Pan ATC(未经转导的)、Pan T CD19 CAR2-63、gdT细胞ATC(未经转导的)和CD19 CAR2-63 gdT细胞在培养中扩增以达到用于进一步体外和体内研究的细胞总数。在冷冻细胞用于进一步研究之前,通过流式细胞术检测转导效率。

[0174] 表2: 实验组

组	处理	组大小	第 0 天进行处理 (肿瘤注射之后一天)	
			处理量	TE
1	未经处理的对照	10	n/a	n/a
2	ATC	10	匹配的细胞总数	n/a
3	CAR-T	10	$1 \times 10^7$ 个 CAR+细胞	43%
4	$\gamma\delta$ -T	10	匹配的细胞总数	n/a
5	$\gamma\delta$ -CAR-T	10	$1 \times 10^7$ 个 CAR+细胞	40%
6	CAR-T	5	$2 \times 10^6$ 个 CAR+细胞	43%
7	$\gamma\delta$ -CAR-T	5	$2 \times 10^6$ 个 CAR+细胞	40%

[0176] 所有动物实验的处理和维持均符合实验室动物护理和使用指南。从杰克逊实验室(Jackson Laboratory)(缅因州巴尔港)购买的八周龄雌性NSG免疫缺陷小鼠在第1天通过尾静脉用 $1 \times 10^6$  Luc-GFP标记的Raji细胞静脉内(i.v.)接种。一天后(第0天),静脉内注射根据下表的T细胞。

[0177] 密切监测动物的体重减轻、后肢瘫痪、活动能力丧失或痛苦迹象。经历后肢麻痹、垂死行为或体重减轻超过20%的动物被实施安乐死。

[0178] 每周使用IVIS光谱体内成像系统(马萨诸塞州沃尔瑟姆的珀金埃尔默公司)通过生物发光成像测量肿瘤负荷。在T细胞注射之后3小时、第1天、第2天、然后每周通过尾静脉放血采集外周血液样品,并分组汇集。用APC缀合的小鼠抗人CD3抗体和PE缀合的小鼠抗myc抗体通过流式细胞术测量T细胞移植和扩增。使用Bio-Rad Luminex测定(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司(Bio-Rad, Hercules, CA))测量人细胞因子IFN $\gamma$ 、IL2和TNF $\alpha$ 的血液水

平。监测动物的疾病进展和明显毒性的迹象,如移植物抗宿主病(GVHD),其证据是体重减轻 $>15\%$ ,失去皮毛,并变得奄奄一息。存活率研究的终点是小鼠体重减轻超过 $15\%$ 或濒临死亡的那一天。

[0179] 图10A和B提供了六周研究过程中小鼠的图像。图10A示出了,未经处理的小鼠和用未经修饰的 $\gamma\delta$ T细胞处理的小鼠没有存活超过2周,而用未经修饰的pan T细胞(ATC)处理的小鼠没有存活超过4周,死于移植物抗宿主病。表达CD19 CAR构建体的Pan T细胞(第3组)具有最好的存活率,其中所有10只小鼠都存活了6周。图10B示出了用 $10^7$ 个表达CD19 CAR的 $\gamma\delta$ T细胞处理的所有10只第5组小鼠存活至第5周。用较少CAR-T细胞处理的第6组和第7组存活至第6周的小鼠较少:用 $2 \times 10^6$ 个(pan) CAR-T细胞处理的第6组的10只小鼠中仅有3只以及用 $2 \times 10^6$ 个 $\gamma\delta$ CAR-T细胞处理的第7组的5只小鼠中仅有1只存活至第6周。

[0180] 图11A提供了基于处理组中辐照度的肿瘤大小图。未经处理或用未经修饰的 $\gamma\delta$ T细胞(未用CD19 CAR构建体转导的 $\gamma\delta$ T细胞)处理的组中的肿瘤生长最快。用 $1 \times 10^7$ 个pan T细胞(未用CAR构建体转导)处理的小鼠具有最初快速生长但随后缩小的肿瘤。在用 $2 \times 10^6$ 个 $\gamma\delta$ CAR-T细胞、 $1 \times 10^7$ 个 $\gamma\delta$ CAR-T细胞和 $2 \times 10^6$ 个pan T细胞(未用CAR构建体转导)处理的小鼠中,肿瘤在短暂延迟之后生长。用 $1 \times 10^7$ 个CAR-T细胞处理的小鼠的肿瘤生长最慢。图11B提供了同一时间段内每组小鼠的体重,示出了未经处理组、pan-T组和经gdT处理组的急剧下降的体重。

[0181] 图12A提供了处理组的存活率曲线。未接受任何细胞处理的小鼠(虚线)和接受未经修饰的 $\gamma\delta$ T细胞的小鼠(正方形)在十四天时存活率的下降是明显的。在用pan T CAR-T细胞(圆圈)处理的小鼠中证实了最高的存活率:在六周研究结束时,此处理组中没有小鼠死亡。用gdT CAR-T细胞处理的小鼠存活了五周。图12B提供了存活率的另外的图,其中接受较低细胞剂量的CAR-T细胞的第6组和第7组已被去除。pan T处理组(无CAR表达)示出了从第28天开始存活率下降,导致所有小鼠在第35天死亡。gd CAR-T处理组显示出存活至第35天,此时所有小鼠死亡(竖直线)。水平线证明pan CAR-T细胞处理组的所有小鼠都存活至第42天。图12C提供了另外的存活率图,其中用gdT细胞处理的第4组、第5组和第7组已被去除。所述图比较了未经处理的小鼠(第14天的竖直线)、用pan T细胞处理的小鼠(第28天与第35天之间存活率下降)、用pan CART-T细胞处理的小鼠(水平线显示无死亡率)和用较低剂量的pan CART-T细胞处理的小鼠(所有小鼠在第35天死亡)。

[0182] 图13A提供了另外的图,提供了未经处理的组(第14天的竖直线)、pan T细胞处理组(从第28天至第35天存活率下降)和pan-CAR-T细胞处理组(显示出在整个6周实验中存活率没有下降的水平线)的存活率。图13B比较了未经处理组(第14天的竖直线)、gdT细胞处理组(存活至第14天)、gdT  $10^7$ 细胞处理组(存活至第35天)和gdT  $2 \times 10^6$ 细胞处理组(存活从第28天至第35天下降)的存活率。图13C比较了未经处理组(第14天的竖直线)、gdT细胞处理组(存活至第14天)和gdT  $10^7$ 细胞处理组(存活至第35天)的存活率。

[0183] 表3提供了一些组的存活率差异的显著性水平。

[0184] 表3:存活率显著性水平

[0185]

	未经处理	pan T	pan CAR-T	gdT	gd CAR-T	pan CAR-T 2e6	gd CAR-T 2e6
未经处理			> 0.0001 ****		> 0.0001 ****		
pan T			> 0.0001 ****				
pan CAR-T					> 0.0001 ****	> 0.0001 ****	
gdT					> 0.0001 ****		
gdCAR-T							0.0011
pan CAR-T 2e6							0.17 (ns)
gd CAR-T 2e6							



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

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接VH和VL的肽连接子-氨基酸

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8铰链区-氨基酸

<400> 4

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro  
 1 5 10 15

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

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

<210> 5

<211> 40

<212> PRT



<223> CD3-ζ信号传导结构域-氨基酸

<400> 8

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 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln

50                    55                    60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

65                    70                    75                    80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr

85                    90                    95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

100                    105                    110

Arg

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自小鼠抗体重链的信号肽-氨基酸

<400> 9

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1                    5                    10                    15

Val His Ser

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> myc标签-氨基酸

<400> 10

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1                    5                    10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT



Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly  
 210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val  
 225 230 235 240

Ser Ser

<210> 13

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链序列-氨基酸

<400> 13

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro  
 1 5 10 15

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

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

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser  
 50 55 60

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro  
 65 70 75 80

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro  
 85

<210> 14

<211> 541

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD19 CAR2-63-氨基酸

<400> 14

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

Val His Ser Asp Ile Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp  
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp  
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu  
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr															
65					70					75					80
His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser															
					85					90					95
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu															
					100					105					110
Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr															
					115										125
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly															
					130										140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser															
145					150					155					160
Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr															
					165					170					175
Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln															
					180					185					190
Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu															
					195										205
Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys															
					210										220
Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr															
225					230					235					240
Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly															
					245					250					255
Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser															
					260					265					270
Ser Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala															
					275										285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg															
					290										300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Pro															
305					310					315					320
Arg Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys															
					325					330					335
Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser															
					340					345					350
Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val															
					355										365
Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile															

370	375	380
Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr		
385	390	395
Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln		
	405	410
Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys		
	420	425
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln		
	435	440
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu		
450	455	460
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg		
465	470	475
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		
	485	490
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly		
	500	505
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp		
	515	520
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
	530	540

<210> 15

<211> 1626

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码抗CD19 CAR2-63的DNA序列

<400> 15

```

atggagtggc cctgggtggt cctgtttttc ctgagcgtca caaccggtgt gcatagtgat      60
attgagcaga agctgattag cgaagaggac ctggatatcc agatgacaca gaccaccagc      120
agcctgagcg ccagcctggg cgaccgagtg actatcagct gccgggcatc ccaggatatt      180
tctaaagtatc tgaactggta ccagcagaag cccgacggca ctgtcaaact gctgatctac      240
cacaccagta gactgcattc aggggtgect agcaggttct ccggatctgg cagtgggact      300
gactactccc tgaccatctc taacctggag caggaagata ttgccaccta tttctgccag      360
cagggcaata cactgcctta cacttttggc gggggaacaa agctggagat cactggcgga      420
ggaggatctg gaggaggagg aagtggagga ggaggatcag aggtgaaact gcaggaaagc      480
ggaccaggac tggtcgcacc ttcacagagc ctgtccgtga catgtactgt ctccggagtg      540
tctctgcccc attacggcgt ctcttgatc cggcagcccc ctagaaaggg actggagtgg      600
ctgggcgtga tctggggaag tgaaactacc tactataata gtgctctgaa atcaagactg      660

```

accatcatta	aggacaactc	taaaagtcag	gtgtttctga	agatgaattc	cctgcagacc	720
gacgatacag	caatctacta	ttgcgcaaaa	cactactatt	acggcgggag	ctatgccatg	780
gattactggg	ggcagggaac	ttccgtcacc	gtgagcagcg	ctaagcccac	cacgacgcca	840
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcggcccacc	atcgcgtcgc	agcccctgtc	cctgcgcccc	900
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca	gtgcacacga	gggggctgga	cttcgcccct	960
agggaaaattg	aagttatgta	tcctcctcct	tacctagaca	atgagaagag	caatggaacc	1020
attatccatg	tgaaagggaa	acacctttgt	ccaagtcccc	tatttcccgg	accttctaag	1080
cccttttggg	tgctggtggt	ggttggtgga	gtcctggctt	gctatagctt	gctagtaaca	1140
gtggccttta	ttattttctg	ggtgaggagt	aagaggagca	ggctcctgca	cagtgactac	1200
atgaacatga	ctccccgccc	ccccgggccc	accgcaagc	attaccagcc	ctatgcccc	1260
ccacgcgact	tcgcagccta	tcgctccaga	gtgaagttea	gcaggagcgc	agacgcccc	1320
gcgtaccagc	agggccagaa	ccagctctat	aacgagctca	atctaggacg	aagagaggag	1380
tacgatgttt	tggacaagag	acgtggcccg	gacctgaga	tggggggaaa	gccgagaagg	1440
aagaaccctc	aggaaggcct	gtacaatgaa	ctgcagaaag	ataagatggc	ggaggcctac	1500
agtgagattg	ggatgaaagg	cgagcggccc	aggggcaagg	ggcacgatgg	cctttaccag	1560
ggtctcagta	cagccaccaa	ggacacctac	gacgcccttc	acatgcaggc	cctgccccct	1620
cgctaa						1626
<210>	16					
<211>	8013					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	编码抗CD19 CAR2-63的逆转录病毒载体的DNA序列(从起始密码子到终止密码子)					
<400>	16					
aagcttgc	gcctgcaggt	cgactctagg	cacataaaga	aaaacataac	taaccaagct	60
gcagccgaga	cagtgaaaag	aaccgttaaa	acggtttggt	ttaaataaac	tgaattat	120
agagtcattt	ctttggtagg	aaagtacatt	ggcacgtaaa	ggagcccaaa	gcaatctgtg	180
gaaagcccag	gctgggagcc	cagcagtttg	catcccctcc	tgcggtgtac	ctaagggttt	240
cttaattgtg	tggtttctaa	atcttccaga	gggtttgtct	cattcacttc	cacttcgggtg	300
cacaatactt	ggacgcggat	ttactgtctt	agcatctatc	ggtggccctt	cgattgaggc	360
tgaacctgag	gcccacttct	tcagcttggt	aaggagagca	caagcaccag	aagaggctga	420
cccggcagac	ctgtgggcat	ttttaacaag	ggcctcctgg	gtctgtggga	ggcaggctta	480
cataaggtgc	aaattagaaa	tataaataat	aagcccatat	caatttgtca	tcttttttta	540
agctcaagtt	ttgaaagacc	ccacctgtag	gtttggcaag	ctagcttaag	taacgccatt	600
ttgcaaggca	tggaaaatac	ataactgaga	atagagaagt	tcagatcaag	gtaggaaca	660
gagagacagc	agaatatggg	ccaaacagga	tatctgtggt	aagcagttcc	tgccccgctc	720
agggccaaga	acagttgtaa	caggagaata	tgggccaaac	aggatatctg	tggttaagcag	780
ttcctgcccc	ggctcagggc	caagaacaga	tggtccccag	atgcggtccc	gcctcagca	840

gtttctagag	aaccatcaga	tgtttccagg	gtgccccaaag	gacctgaaat	gaccctgtgc	900
cttatttgaa	ctaaccaatc	agttcgttc	tcgcttctgt	tcgcgcgctt	ctgctccccg	960
agctcaataa	aagagcccac	aaccctcac	tcggcgcgcc	agtctccga	tagactgcgt	1020
cgccccggta	cccgattcc	caataaagcc	tcttgctgtt	tgcatccgaa	tcgtggactc	1080
gctgatcctt	gggagggtct	cctcagattg	attgactgcc	cacctcgggg	gtctttcatt	1140
tggaggttcc	accgagattt	ggagaccct	gcccaggac	caccgacccc	cccgccggga	1200
ggtaagctgg	ccagcaactt	atctgtgtct	gtccgattgt	ctagtgtcta	tgactgattt	1260
tatgcgcctg	cgtcggtact	agttagctaa	ctagctctgt	atctggcgga	cccgtggtgg	1320
aactgacgag	ttcggaacac	ccggccgcaa	cctggggaga	cgtcccaggg	acttcggggg	1380
ccgtttttgt	ggcccagact	gagtcctaaa	atcccgatcg	tttaggactc	tttggtgcac	1440
cccccttaga	ggagggatat	gtggttctgg	taggagacga	gaacctaaaa	cagttcccgc	1500
ctccgtctga	atTTTTgctt	tcggtttggg	accgaagccg	cgccgcgctt	cttgtctgct	1560
gcagcatcgt	tctgtgttgt	ctctgtctga	ctgtgtttct	gtatttgtct	gaaaatatgg	1620
gcccgggcta	gactgttacc	actcccttaa	gtttgacctt	aggtcactgg	aaagatgtcg	1680
agcggatcgc	tcacaaccag	tcggtagatg	tcaagaagag	acgttgggtt	accttctgct	1740
ctgcagaatg	gccaaccttt	aacgtcggat	ggccgcgaga	cggcaccttt	aaccgagacc	1800
tcataccca	ggtaagatc	aaggtctttt	cacctggccc	gcatggacac	ccagaccagg	1860
tcccctacat	cgtgacctgg	gaagccttgg	cttttgacc	ccctccctgg	gtcaagcctt	1920
ttgtacacc	taagcctccg	cctcctcttc	ctccatccgc	cccgtctctc	ccccttgaac	1980
ctcctcgttc	gaccccgctt	cgatcctccc	tttatccagc	cctcactcct	tctctaggcg	2040
cccccatatg	gccatatgag	atcttatatg	gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	2100
accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	cctctctcca	agctcactta	caggctctct	2160
acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	tggeggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	2220
gaccggtggg	acctcacctt	taccgagtcg	gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	2280
ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	2340
ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttggg	tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	2400
ccgggggtgg	accatcctct	agactgcctc	gcgaggatcc	ctcgaggccg	ccaccatgga	2460
gtggctcctgg	gtgttctgt	ttttctgag	cgtcacaacc	ggtgtgcata	gtgatattga	2520
gcagaagctg	attagcgaag	aggacctgga	tatccagatg	acacagacca	ccagcagcct	2580
gagcgcaccg	ctgggcgacc	gagtgactat	cagctgccgg	gcatcccagg	atatttctaa	2640
gtatctgaac	tggtaccagc	agaagcccga	cggcactgtc	aaactgctga	tctaccacac	2700
cagtagactg	cattcagggg	tgcttagcag	gttctccgga	tctggcagtg	ggactgacta	2760
ctccctgacc	atctctaacc	tggagcagga	agatattgcc	acctatttct	gccagcaggg	2820
caatacactg	ccttacactt	ttggcggggg	aacaaagctg	gagatcactg	gcggaggagg	2880
atctggagga	ggaggaagtg	gaggaggagg	atcagaggtg	aaactgcagg	aaagcggacc	2940
aggactggtc	gcacctcac	agagcctgtc	cgtgacatgt	actgtctccg	gagtgtctct	3000
gcccgattac	ggcgtctctt	ggatccggca	gccccctaga	aaggactgg	agtggctggg	3060
cgtgatctgg	ggaagtgaag	ctacctacta	taatagtgtc	ctgaaatcaa	gactgacat	3120
cattaaggac	aactctaaaa	gtcaggtgtt	tctgaagatg	aattccctgc	agaccgacga	3180

tacagcaatc	tactattgcg	ccaaacacta	ctattacggc	gggagctatg	ccatggatta	3240
ctggggggcag	ggaacttccg	tcaccgtgag	cagcgetaag	cccaccacga	cgccagcgcc	3300
gcgaccacca	acaccggcgc	ccaccatcgc	gtcgcagccc	ctgtccctgc	gcccagaggc	3360
gtgccggcca	gcggcggggg	gcgcagtgca	cacgaggggg	ctggacttcg	cccctaggaa	3420
aattgaagtt	atgtatcctc	ctccttacct	agacaatgag	aagagcaatg	gaaccattat	3480
ccatgtgaaa	gggaaacacc	tttgtccaag	tcccctatth	cccggacctt	ctaagccctt	3540
ttgggtgctg	gtgggtggtg	gtggagtctt	ggcttgctat	agcttgctag	taacagtggc	3600
ctttattatt	ttctgggtga	ggagtaagag	gagcaggctc	ctgcacagtg	actacatgaa	3660
catgactccc	cgccgccccg	ggcccaccgg	caagcattac	cagccctatg	ccccaccacg	3720
cgacttcgca	gcctatcgct	ccagagtgaa	gttcagcagg	agcgcagacg	ccccgcgta	3780
ccagcagggc	cagaaccagc	tctataacga	gctcaatcta	ggacgaagag	aggagtacga	3840
tgttttgac	aagagacgtg	gccgggacc	tgagatgggg	ggaaagccga	gaaggaagaa	3900
ccctcaggaa	ggcctgtaca	atgaactgca	gaaagataag	atggcggagg	cctacagtga	3960
gattgggatg	aaaggcgagc	gccggagggg	caaggggcac	gatggccttt	accagggtct	4020
cagtacagcc	accaaggaca	cctacgacgc	ccttcacatg	caggccctgc	cccctcgcta	4080
acagccaggg	gccgccaag	ggcgaattcg	cggccgcac	gatgcatagg	ccttccggat	4140
tagtccaatt	tgtaaaagac	aggatatcag	tggtccaggc	tctagttttg	actcaacaat	4200
atcaccagct	gaagcctata	gagtacgagc	catagataaa	ataaaagatt	ttatthtagtc	4260
tccagaaaaa	ggggggaatg	aaagaccca	cctgtaggtt	tggcaagcta	gcttaagtaa	4320
cgccatthtg	caaggcatgg	aaaatacata	actgagaata	gagaagttca	gatcaaggtt	4380
aggaacagag	agacagcaga	atatgggcca	aacaggatat	ctgtggtgta	cagttcctgc	4440
cccgtcagg	gccaagaaca	gttggaacag	gagaatatgg	gccaacagg	atatctgtgg	4500
taagcagttc	ctgccccggc	tcagggcaa	gaacagatgg	tccccagatg	cggtcccggc	4560
ctcagcagtt	tctagagaac	catcagatgt	ttccagggtg	cccccaaggac	ctgaaatgac	4620
cctgtgcctt	atthgaaacta	accaatcagt	tcgcttctcg	cttctgttcg	cgcgcttctg	4680
ctccccgagc	tcaataaaag	agcccacaac	ccctcactcg	gcgcgccagt	cctccgatag	4740
actgcgtcgc	ccgggtacc	gtgttctcaa	taaaccctct	tgcagttgca	tccgactcgt	4800
ggtctcgctg	ttccttgga	gggtctctc	tgagtgattg	actaccctgc	agcggggtct	4860
ttcagthtct	cccacctaca	caggtctcac	taacattcct	gatgtgccgc	agggactccg	4920
tcagcccgg	thttgttht	aataaaatgc	aagaacagtg	ttcccttcaa	gccagactac	4980
atcctgactc	tcggcttht	aaaagaatgt	tgaagggtc	tgtggactat	ctgccacacg	5040
actththtaag	atththtatgc	ctcctggatg	agggathtag	tcaatctatc	ctcgtctatt	5100
thgctggctt	ctccgtatth	taaathtcta	gthtgactc	ccttctgag	agcacggcga	5160
thgcagagta	gttaataactc	tgagggcagg	cttctgtgaa	aaggttgctt	gggctcagtg	5220
tgagaththg	ccataaaaag	gggtcctgcc	cctgtgtaca	gacagatcgg	aatctagagt	5280
gcatactcag	agtccccgcg	gttccggggc	tctgatctca	gggcatctth	gcctagagat	5340
cctctacgcc	ggacgcatcg	tggccgggta	ccgagctcga	atthgtaatc	atggctcatag	5400
ctgthtctcg	tgtgaaatg	thtatccgctc	acaathccac	acaacatacg	agccggaagc	5460
ataaagtgta	aagcctgggg	tgcctaata	gtgagctaac	tcacathaat	tgcgthtgcgc	5520

tcaactgcccc	ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgccagc	tgcattaatg	aatcggccaa	5580
cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	cgctcttccg	cttcctcgct	caactgactcg	5640
ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	gatatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg	5700
ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	aagaacatgt	gagcaaaagg	ccagcaaaag	5760
gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	5820
gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	5880
taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	5940
accggatacc	tgtccgcctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	6000
tgtaggtatc	tcagttcggg	gtaggtcggt	cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaacct	6060
cccgttcagc	ccgaccgctg	cgcttatec	ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccggta	6120
agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcgaggat	6180
gtaggcgggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	tagaaggaca	6240
gtatttggta	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	6300
tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	ggtggttttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	6360
acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	6420
cagtggaacg	aaaactcacg	ttaagggatt	ttggtcatga	gattatcaaa	aaggatcttc	6480
acctagatcc	ttttaaatta	aaaatgaagt	tttaaataca	tctaaagtat	atatgagtaa	6540
acttggctctg	acagttacca	atgcttaatc	agtgaggcac	ctatctcagc	gatctgtcta	6600
tttcgttcat	ccatagttgc	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	acgggagggc	6660
ttaccatctg	gccccagtgc	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgctcacc	ggctccagat	6720
ttatcagcaa	taaaccagcc	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtggctc	tgcaacttta	6780
tccgcctcca	tccagtctat	taattgttgc	cgggaagcta	gagtaagtag	ttcggcagtt	6840
aatagtttgc	gcaacgttgt	tgccattgct	acaggcatcg	tggtgtcacg	ctcgtcgttt	6900
ggtatggctt	cattcagctc	cggttcccaa	cgatcaaggc	gagttacatg	atcccccatg	6960
ttgtgcaaaa	aagcggtag	ctccttcggt	cctccgatcg	ttgtcagaag	taagttggcc	7020
gcagtgttat	caactcatgt	tatggcagca	ctgcataatt	ctcttactgt	catgccatcc	7080
gtaagatgct	tttctgtgac	tggtgagtac	tcaaccaagt	cattctgaga	atagtgtatg	7140
cggcgaccga	gttgctcttg	cccggcgctc	atacgggata	ataccgcgcc	acatagcaga	7200
actttaaaag	tgctcatcat	tggaaaacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	aaggatctta	7260
ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaacct	actcgtgcac	ccaactgatc	ttcagcatct	7320
tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	cgcaaaaaag	7380
ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaata	ctcactactct	tcctttttca	atattattga	7440
agcatttatc	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	7500
aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	ctaagaaacc	7560
attattatca	tgacattaac	ctataaaaat	aggcgtatca	cgaggccctt	tcgtctcgcg	7620
cgtttcgggtg	atgacggtga	aaacctctga	cacatgcagc	tcccggagac	ggtcacagct	7680
tgtctgtaag	cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgttggc	7740
gggtgtcggg	gctggcttaa	ctatgcggca	tcagagcaga	ttgtactgag	agtgacccat	7800
atgcgggtgtg	aaataccgca	cagatgcgta	aggagaaaat	accgcatcag	gcgccattcg	7860

ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggg cgatecgtgc gggcctcttc gctattacgc 7920  
 cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc 7980  
 cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gcc 8013

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG1上部铰链序列

<400> 17

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 下部铰链/CH2序列

<400> 18

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH2区

<400> 19

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

1 5 10

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链序列

<400> 20

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15



130	135	140
Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala		
145	150	155
Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp		
	165	170
Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly		
	180	185
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu		
	195	200
Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln		
210	215	220
Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu		
225	230	235
Ile Thr		
<210> 23		
<211> 522		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CD19 CAR2-63(成熟多肽)		
<400> 23		
Asp Ile Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp Ile Gln Met		
1	5	10
Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr		
	20	25
Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr		
	35	40
Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser		
	50	55
Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
65	70	75
Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala		
	85	90
Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly		
	100	105
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	115	120
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly		
130	135	140



450	455	460
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala		
465	470	475
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His		480
	485	490
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp		495
	500	505
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		510
	515	520
<210> 24		
<211> 529		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CD19 CAR2-63a(具有信号肽的前体)		
<400> 24		
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
1	5	10
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala		
	20	25
Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile		
	35	40
Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys		
	50	55
Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg		
65	70	75
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn		
	85	90
Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr		
	100	105
Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly		
	115	120
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys		
	130	135
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser		
145	150	155
Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser		
	165	170
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile		



Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr  
 500 505 510  
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro  
 515 520 525

Arg

<210> 25

<211> 1590

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码CD19 CAR2-63a的DNA序列

<400> 25

```

atggaatggt catgggtctt tctctttttt ctcagcgtga ccaccggagt ccaactccgat      60
atccagatga cacagaccac cagcagcctg agcgcacgcc tgggcgaccg agtgactatc      120
agctgccggg catcccagga tatttctaag tatctgaact ggtaccagca gaagcccgcac      180
ggcactgtca aactgctgat ctaccacacc agtagactgc attcaggggt gcctagcagg      240
ttctccgat ctggcagtgg gactgactac tcctgacca tctctaacct ggagcaggaa      300
gatattgcca cctatttctg ccagcagggc aatacactgc cttacacttt tggcggggga      360
acaagactgg agatcactgg cggaggagga tctggaggag gaggaagtgg aggaggagga      420
tcagaggtga aactgcagga aagcggacca ggactggtcg caccttcaca gagcctgtcc      480
gtgacatgta ctgtctccgg agtgtctctg cccgattacg gcgtctcttg gatccggcag      540
ccccctagaa agggactgga gtggctgggc gtgatctggg gaagtgaaac tacctactat      600
aatagtgctc tgaaatcaag actgaccatc attaaggaca actctaaaag tcaggtgttt      660
ctgaagatga attccctgca gaccgacgat acagcaatct actattgcgc caaacactac      720
tattacggcg ggagctatgc catggattac tgggggcagg gaacttccgt caccgtgagc      780
agcgctaagc ccaccacgac gccagcgcg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg      840
tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac      900
acgagggggc tggacttcgc ccctaggaaa attgaagtta tgtatcctcc tccttaccta      960
gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc catgtgaaag ggaaacacct ttgtccaagt     1020
cccctatttc cggaccttc taagcccttt tgggtgctgg tgggtggttg tggagtctctg     1080
gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc tttattattt tctgggtgag gagtaagagg     1140
agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac atgactcccc gccgccccgg gccaccgcc     1200
aagcattacc agccctatgc cccaccacgc gacttcgcag cctatcgctc cagagtgaag     1260
ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag     1320
ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggacct     1380
gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag     1440
aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc     1500
aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc     1560
cttcacatgc aggccctgcc ccctcgctaa
  
```

<210>	26								
<211>	7976								
<212>	DNA								
<213>	人工序列								
<220>									
<223>	编码CD19 CAR2-63a的逆转录病毒载体的DNA序列								
<400>	26								
aagcttgcat	gcctgcaggt	cgactctagg	cacataaaga	aaaacataac	taaccaagct				60
gcagccgaga	cagtgaaaag	aaccgttaa	acggtttgtt	ttaaataaac	tgaattattt				120
agagtcattt	ctttggtagg	aaagtacatt	ggcacgtaa	ggagccaaa	gcaatctgtg				180
gaaagcccag	gctgggagcc	cagcagttg	cateccctec	tggcgtgtac	ctaagggtt				240
cttaattgtg	tggtttctaa	atcttccaga	gggtttgtct	cattcacttc	cacttcgggtg				300
cacaatactt	ggacgcggat	ttactgtctt	agcatctatc	ggtggccctt	cgattgaggc				360
tgaacctgag	gcccacttct	tcagcttggt	aaggagagca	caagcaccag	aagaggctga				420
cccggcagac	ctgtgggcat	ttttaacaag	ggcctcctgg	gtctgtggga	ggcaggctta				480
cataaggtgc	aaattagaaa	tataaataat	aagcccatat	caatttgtca	tcttttttta				540
agctcaagtt	ttgaaagacc	ccacctgtag	gtttggcaag	ctagcttaag	taacgccatt				600
ttgcaaggca	tggaaaatac	ataactgaga	atagagaagt	tcagatcaag	gtaggaaca				660
gagagacagc	agaatatggg	ccaaacagga	tatctgtggt	aagcagttcc	tgccccgctc				720
agggccaaaga	acagttggaa	caggagaata	tggccaaac	aggatatctg	tggttaagcag				780
ttcctgcccc	ggctcagggc	caagaacaga	tggccccag	atgcggtccc	gccctcagca				840
gtttctagag	aaccatcaga	tgtttccagg	gtgccccag	gacctgaaat	gaccctgtgc				900
cttatttgaa	ctaaccaatc	agttcgttcc	tcgcttctgt	tcgcgcgctt	ctgctccccg				960
agctcaataa	aagagcccac	aaccctcac	tcggcgcgcc	agtctccga	tagactgcgt				1020
cgccccggta	cccgtattcc	caataaagcc	tcttgctggt	tgcattccga	tcgtggactc				1080
gctgatcctt	gggagggctt	cctcagattg	attgactgcc	cacctcgggg	gtctttcatt				1140
tggaggttcc	accgagattt	ggagaccct	gccagggac	caccgacccc	cccgccggga				1200
ggtaagctgg	ccagcaactt	atctgtgtct	gtccgattgt	ctagtgtcta	tgactgattt				1260
tatgcgcctg	cgtcggtact	agttagctaa	ctagctctgt	atctggcgga	cccgtggtgg				1320
aactgacgag	ttcggaacac	ccggccgcaa	cctggggaga	cgtcccaggg	acttcggggg				1380
ccgtttttgt	ggccccgacct	gagtcctaaa	atcccgatcg	tttaggactc	tttggtgcac				1440
cccccttaga	ggagggatat	gtggttctgg	taggagacga	gaacctaaaa	cagttccccg				1500
ctccgtctga	atTTTTgttt	tcggtttggg	accgaagccg	cgccgcgctt	cttgtctgct				1560
gcagcatcgt	tctgtgttgt	ctctgtctga	ctgtgtttct	gtatttgtct	gaaaatatgg				1620
gccccgggcta	gactgttacc	actcccttaa	gtttgacctt	aggtcactgg	aaagatgtcg				1680
agcggatcgc	tcacaaccag	tcggtagatg	tcaagaagag	acgttgggtt	accttctgct				1740
ctgcagaatg	gccaaccttt	aacgtcggat	ggccgcgaga	cggcaccttt	aaccgagacc				1800
tcatacccca	ggtaagatc	aaggtctttt	cacctggccc	gcatggacac	ccagaccagg				1860
tcccctacat	cgtgacctgg	gaagccttgg	cttttgacct	ccctccctgg	gtcaagccct				1920

ttgtacaccc	taagcctccg	cctcctcttc	ctccatccgc	cccgtctctc	ccccttgaac	1980
ctcctcgttc	gaccccgctt	cgatcctccc	tttatccage	cctcactcct	tctctaggcg	2040
cccccatatg	gccatatgag	atcttatatg	gggcaccccc	gccccttgta	aacttccctg	2100
accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	cctctctcca	agctcactta	caggctctct	2160
acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	2220
gaccggtggt	acctcaccct	taccgagtcg	gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	2280
ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	2340
ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttggg	tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	2400
ccgggggtgg	accatcctct	agactgcctc	gcgaggatcc	ctcgaggccg	ccaccatgga	2460
atggtcatgg	gtctttctct	tttttctcag	cgtgaccacc	ggagtccact	ccgatatcca	2520
gatgacacag	accaccagca	gctgagcgc	cagcctgggc	gaccgagtga	ctatcagctg	2580
ccgggcatcc	caggatattt	ctaagtatct	gaactggtac	cagcagaagc	ccgacggcac	2640
tgtcaaactg	ctgatctacc	acaccagtag	actgcattca	ggggtgccta	gcaggttctc	2700
cggatctggc	agtgggactg	actactcctt	gaccatctct	aacctggagc	aggaagatat	2760
tgccacctat	ttctgccagc	agggaatac	actgccttac	acttttggcg	ggggaacaaa	2820
gctggagatc	actggcggag	gaggatctgg	aggaggagga	agtggaggag	gaggatcaga	2880
ggtgaaactg	caggaaagcg	gaccaggact	ggtcgcacct	tcacagagcc	tgtccgtgac	2940
atgtactgtc	tccggagtgt	ctctgcccga	ttacggcgtc	tcttgatcc	ggcagcccc	3000
tagaaagga	ctggagtggc	tgggcgtgat	ctggggaagt	gaaactacct	actataatag	3060
tgctctgaaa	tcaagactga	ccatcattaa	ggacaactct	aaaagtcagg	tgtttctgaa	3120
gatgaattcc	ctgcagaccg	acgatacagc	aatctactat	tgcgccaac	actactatta	3180
cggcgggagc	tatgccatgg	attactgggg	gcagggaaact	tccgtcaccg	tgagcagcgc	3240
taagcccacc	acgacgccag	cgccgcgacc	accaacaccg	gcgcccacca	tcgctcgca	3300
gcccctgtcc	ctgcgccag	aggcgtgccg	gccagcggcg	gggggcgcag	tgcacacgag	3360
ggggctggac	ttcgccccta	ggaaaattga	agttatgtat	cctctctctt	acctagacaa	3420
tgagaagagc	aatggaacca	ttatccatgt	gaaagggaaa	cacctttgtc	caagtcccct	3480
atttcccgga	ccttctaagc	ccttttgggt	gctggtggtg	gttggtggag	tcctggcttg	3540
ctatagcttg	ctagtaacag	tggcctttat	tattttctgg	gtgaggagta	agaggagcag	3600
gctcctgcac	agtgactaca	tgaacatgac	tccccgccgc	cccgggcca	cccgaagca	3660
ttaccagccc	tatgccccac	cacgcgactt	cgcagcctat	cgctccagag	tgaagttcag	3720
caggagcgca	gacgcccccg	cgtaccagca	gggccagaac	cagctctata	acgagctcaa	3780
tctaggacga	agagaggagt	acgatgtttt	ggacaagaga	cgtggccggg	accctgagat	3840
ggggggaaaag	ccgagaagga	agaacctca	ggaaggcctg	tacaatgaac	tgcaaaaaga	3900
taagatggcg	gaggcctaca	gtgagattgg	gatgaaaggc	gagcgcggga	ggggcaaggg	3960
gcacgatggc	ctttaccagg	gtctcagtac	agccaccaag	gacacctacg	acgcccttca	4020
catgcaggcc	ctgccccctc	gctaacagcc	aggggcccgc	caaggcgaa	ttcgcggccg	4080
catgatcat	aggccttccg	gattagtcca	atgtgttaa	gacaggatat	cagtggctca	4140
ggctctagtt	ttgactcaac	aatatcacca	gctgaagcct	atagagtacg	agccatagat	4200
aaaataaaaag	attttattta	gtctccagaa	aaagggggga	atgaaagacc	ccacctgtag	4260

gtttggcaag	ctagcttaag	taacgccatt	ttgcaaggca	tggaaaatac	ataactgaga	4320
atagagaagt	tcagatcaag	gtaggaaca	gagagacagc	agaatatggg	caaacagga	4380
tatctgtggt	aagcagttcc	tgccccgctc	aggccaaga	acagttgga	caggagaata	4440
tgggccaac	aggatatctg	tgtaagcag	ttctgcccc	ggctcagggc	caagaacaga	4500
tggccccag	atgcggtccc	gccctcagca	gtttctagag	aaccatcaga	tgttccagg	4560
gtgccccaa	gacctgaaat	gacctgtgc	cttatttgaa	ctaaccaatc	agttcgcttc	4620
tcgcttctgt	tcgcgcgctt	ctgctccccg	agctcaataa	aagagcccac	aaccctcac	4680
tcggcgcgcc	agtccctccga	tagactgegt	cgccccggta	cccgtgttct	caataaaccc	4740
tcttgagtt	gcatccgact	cgtggtctcg	ctgttcttg	ggagggtctc	ctctgagtga	4800
ttgactacc	gtcagcgggg	tctttcagtt	tctcccacct	acacaggtct	cactaacatt	4860
cctgatgtgc	cgcagggact	ccgtcagccc	ggtttttggt	tataataaaa	tgcaagaaca	4920
gtgttccctt	caagccagac	tacatctga	ctctcggtt	tataaaagaa	tgttgaagg	4980
ctctgtggac	tatctgccac	acgaattttt	aagattttta	tgctctctgg	atgagggtt	5040
tagtcaatct	atcctcgtct	attttgetgg	cttctccgta	ttttaaat	ctagtttga	5100
ctccccttct	gagagcacgg	cgattgcaga	gtagttaata	ctctgagggc	aggcttctgt	5160
gaaaagggtg	cctgggctca	gtgtgagatt	ttgccataaa	aagggtcct	gccctgtgt	5220
acagacagat	cggaatctag	agtgcatact	cagagtcccc	gcggttccgg	ggctctgatc	5280
tcagggcac	tttgctaga	gatcctctac	gccggacgca	tcgtggccgg	gtaccgagct	5340
cgaattcgta	atcatggtca	tagctgtttc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	ctcacaatc	5400
cacacaacat	acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	gggtgcctaa	tgagtgagct	5460
aactcacatt	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	5520
agctgcatta	atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcgg	tttgcgtatt	ggcgctctt	5580
ccgcttctc	gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcgttcg	gctgcggcga	gcggtatcag	5640
ctcactcaaa	ggcggtaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	5700
tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcgtttt	5760
tccataggct	ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagaggtggc	5820
gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	tggaagctcc	ctcgtgcgct	5880
ctcctgttcc	gacctgccc	cttaccgat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	5940
tggcgctttc	tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	gttcgctcca	6000
agctgggctg	tgtgacgaa	cccccgctt	agcccagccg	ctgcgcctta	tccgtaact	6060
atcgtcttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	6120
acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tggtagccta	6180
actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	6240
tcgaaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaaaaac	caccgctggt	agcggtggtt	6300
tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	gatcctttga	6360
tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	acgttaagg	atcttggta	6420
tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	ttaaaaatga	agttttaaat	6480
caatctaaag	tatatatgag	taaacttggt	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtgagg	6540
cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcggt	catccatagt	tgctgactc	cccgtcgtgt	6600

agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag 6660  
 acccacgctc accggtcca gatttatcag caataacca gccagccgga agggccgagc 6720  
 gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag 6780  
 ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca 6840  
 tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa 6900  
 ggcgagttac atgatcccc atgttgca aaaaagcgg tagctccttc ggtcctccga 6960  
 tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat ggttatggca gactgcata 7020  
 attctcttac tgcatgcca tccgtaagat gttttctgt gactggtgag tactcaacca 7080  
 agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgccggcg tcaatacggg 7140  
 ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaa cgttcttcgg 7200  
 ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg 7260  
 cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag 7320  
 gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac 7380  
 tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca 7440  
 tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc gcgcacattt cccgaaaag 7500  
 tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta 7560  
 tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaacctc tgacacatgc 7620  
 agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc 7680  
 agggcgcgctc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc 7740  
 agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa 7800  
 aataccgcat caggcgcctc tcgccattca ggctgcgcaa ctggtgggaa gggcgatcgg 7860  
 tgccggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa 7920  
 gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttataa aacgacggcc agtgcc 7976

<210> 27

<211> 510

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD19 CAR2-63a,成熟多肽

<400> 27

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

65		70		75		80									
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				100					105					110	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu
				115					120					125	
Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys
				130					135					140	
Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg
145						150								155	160
Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser
				165										170	175
Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile
				180										185	190
Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln
				195										200	205
Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly
				210										215	220
Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val
225						230								235	240
Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro
				245										250	255
Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys
				260										265	270
Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala
				275										280	285
Pro	Arg	Lys	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu
				290										295	300
Lys	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro
305						310								315	320
Ser	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val
				325										330	335
Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe
				340										345	350
Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp
				355										360	365
Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr
				370										375	380

Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val																		
385					390						395							400
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn																		
					405						410							415
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val																		
					420						425							430
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg																		
					435						440							445
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys																		
					450						455							460
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg																		
465																		480
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys																		
					485						490							495
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg																		
					500						505							510

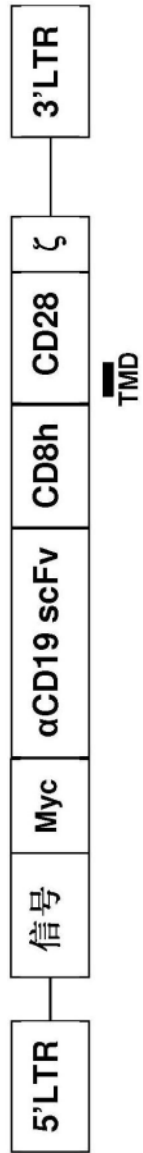


图1A

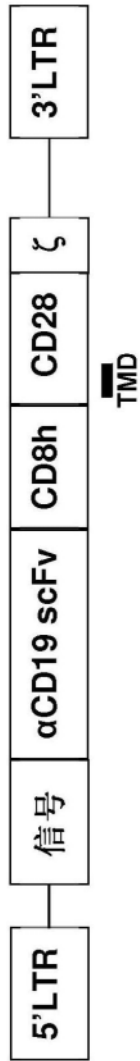


图1B

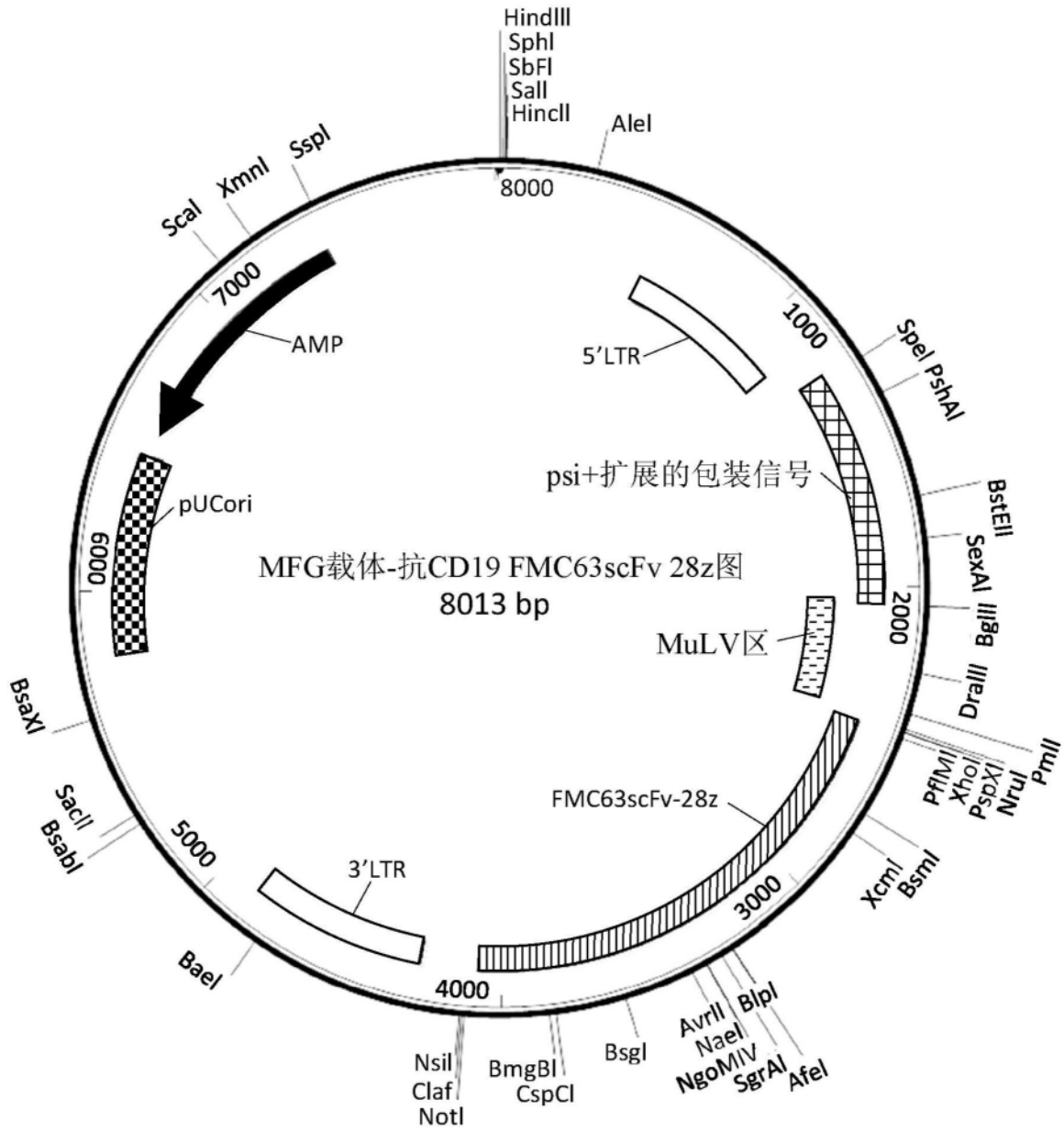


图2

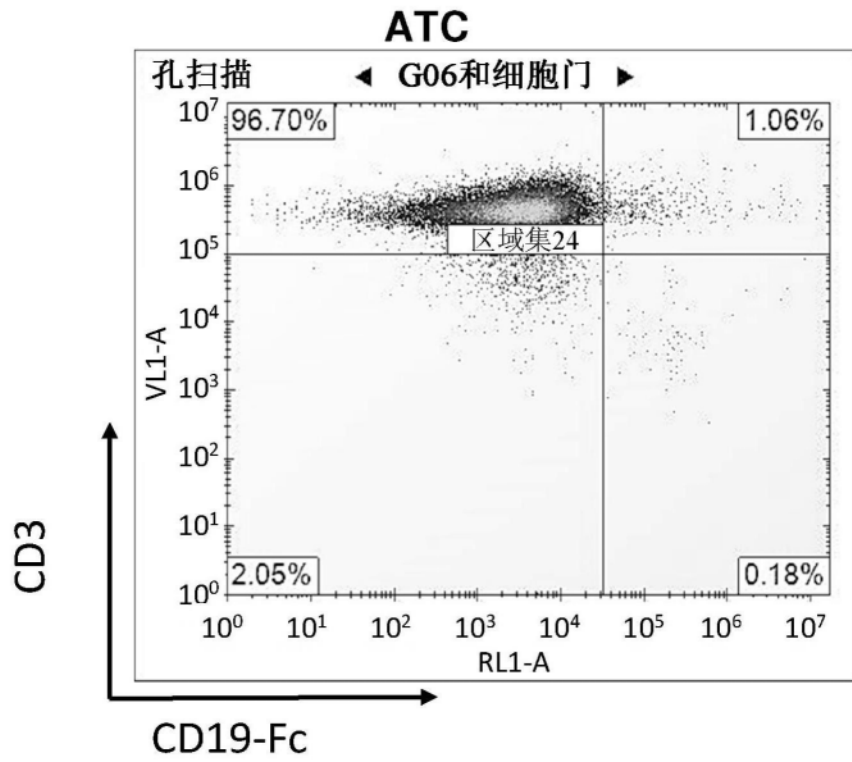


图3A

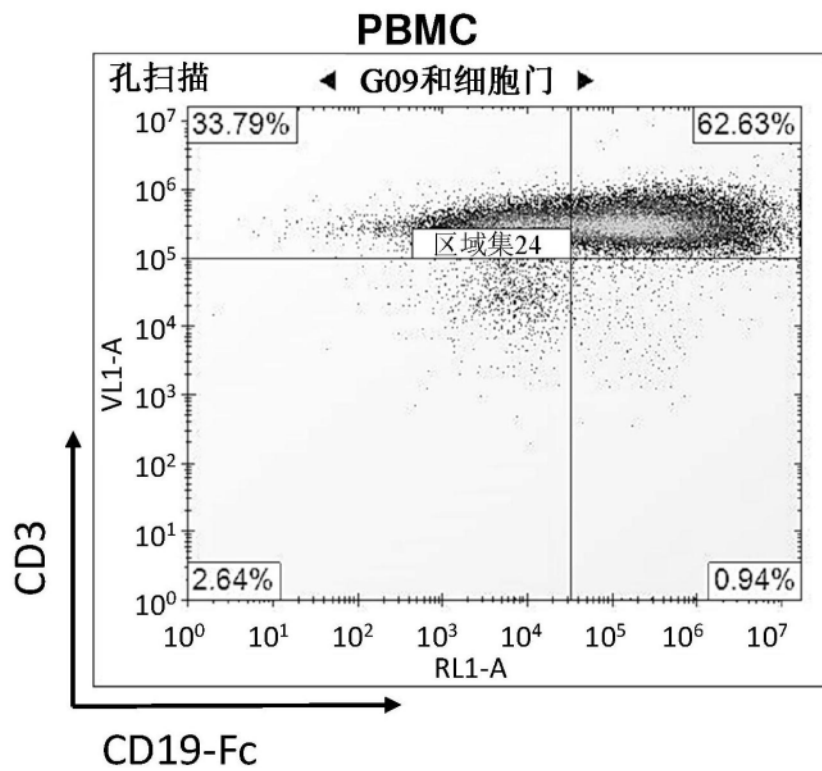


图3B

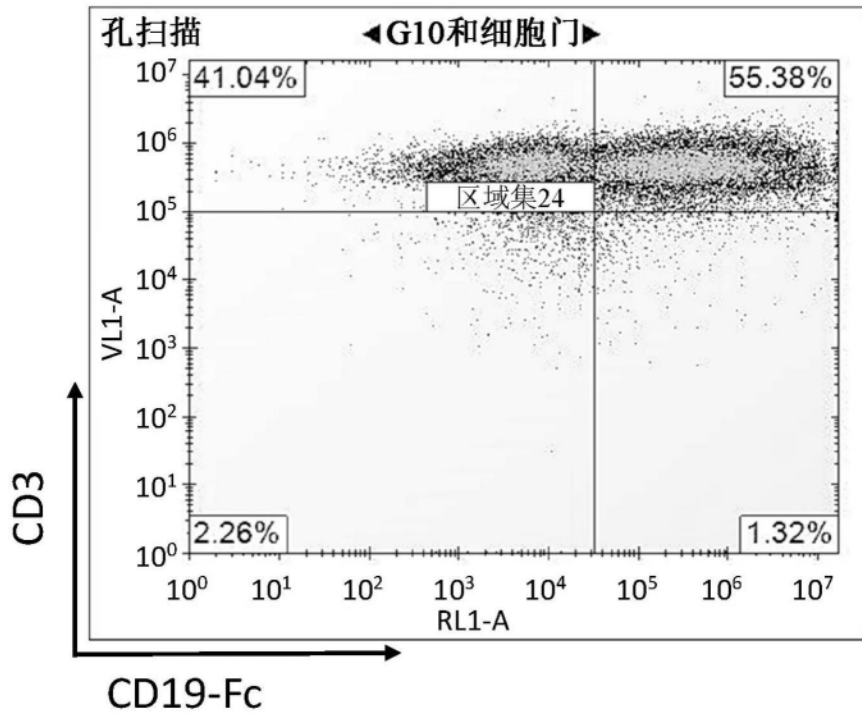
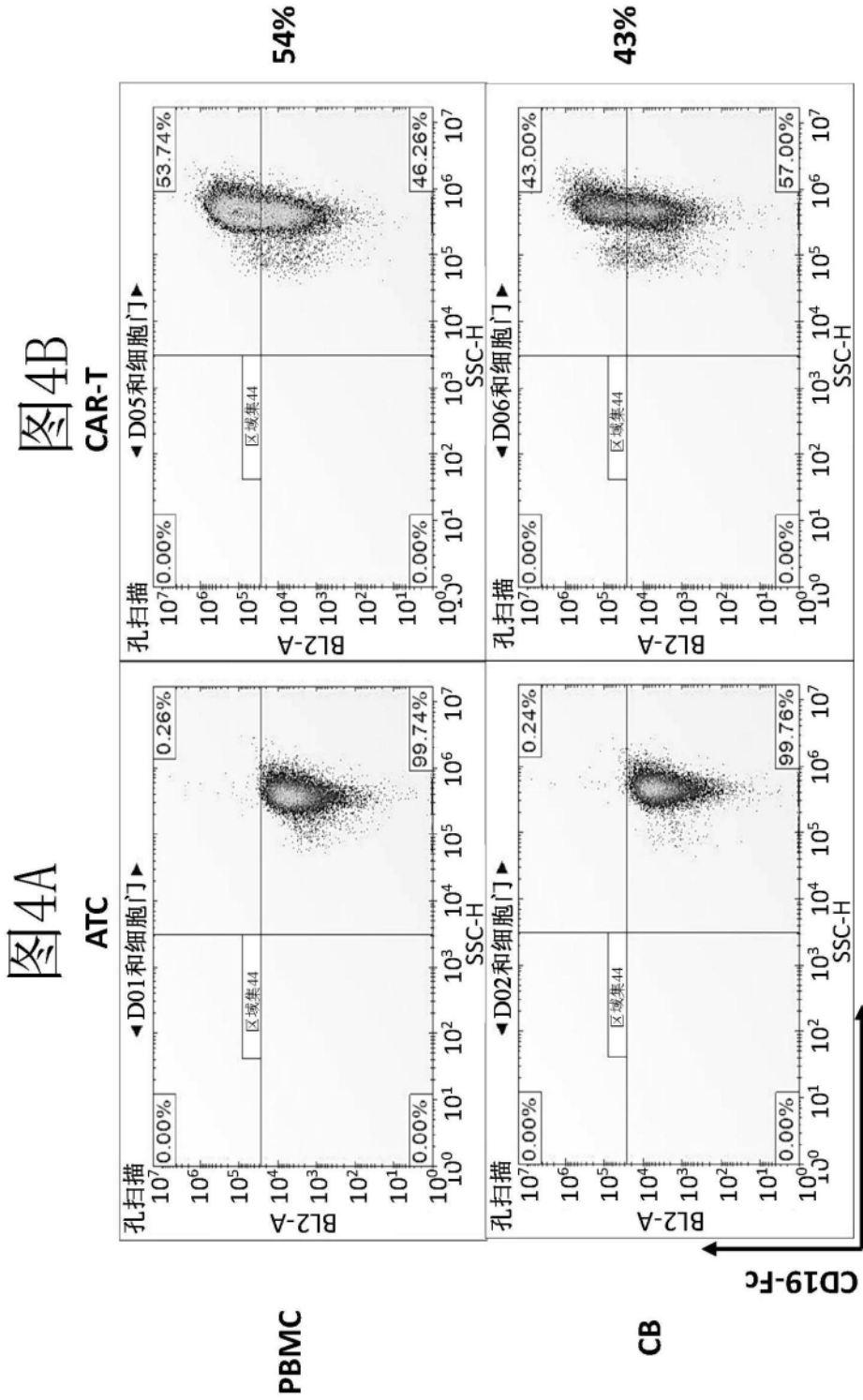


图3C



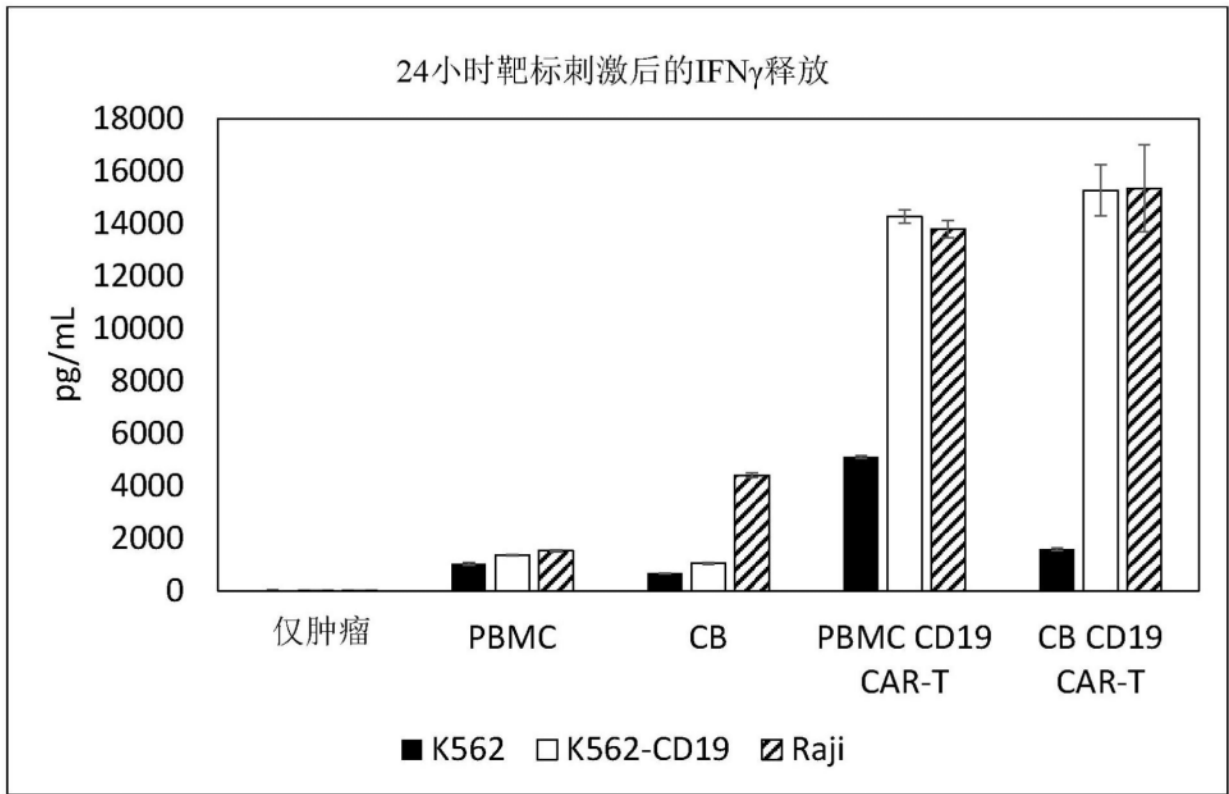


图5

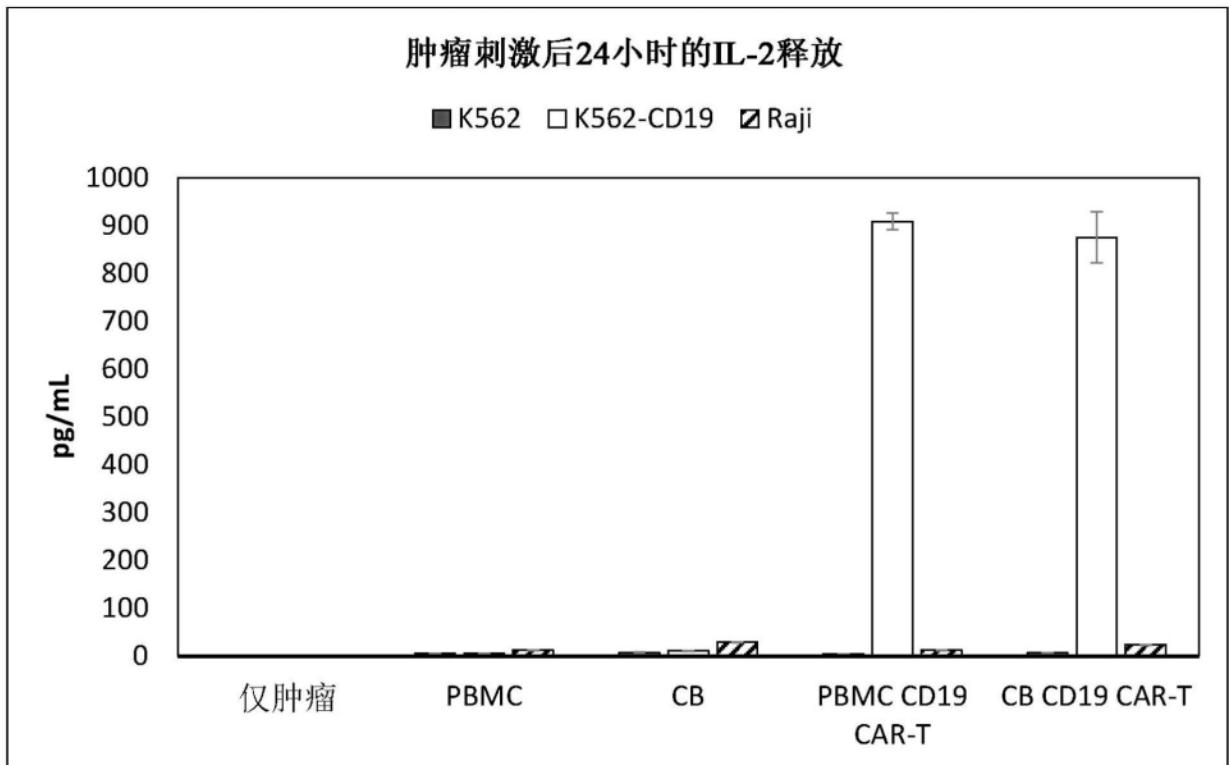


图6

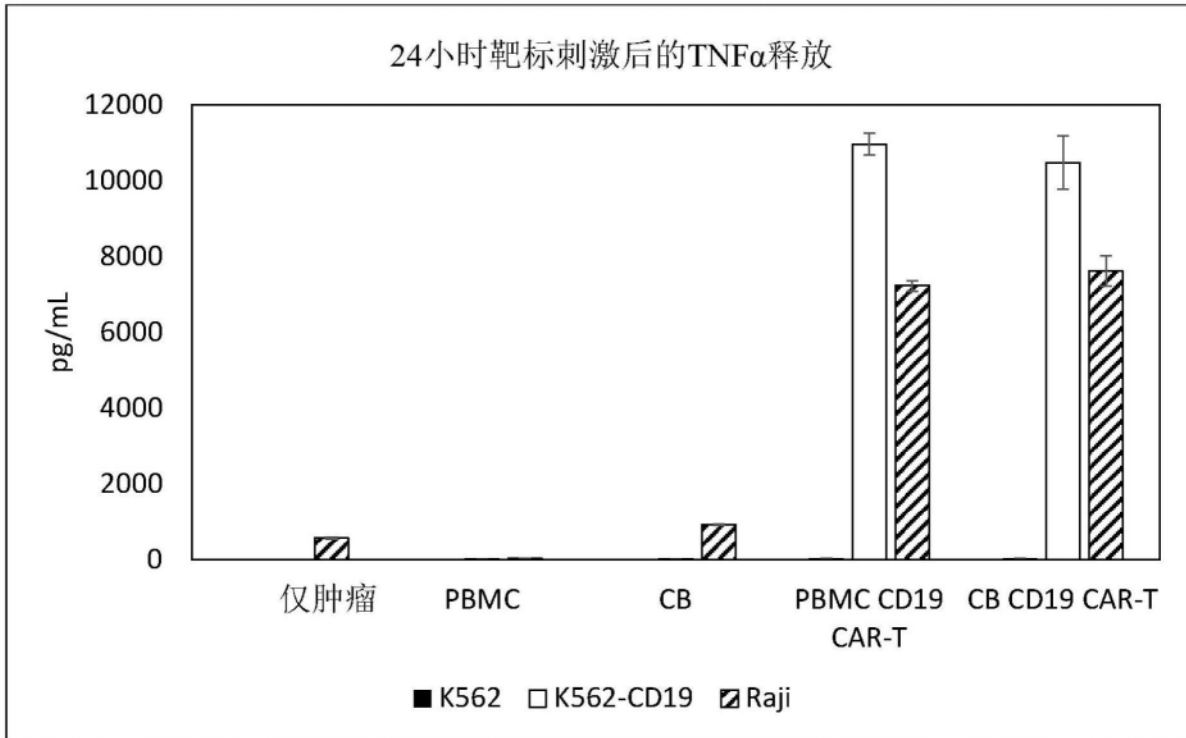


图7

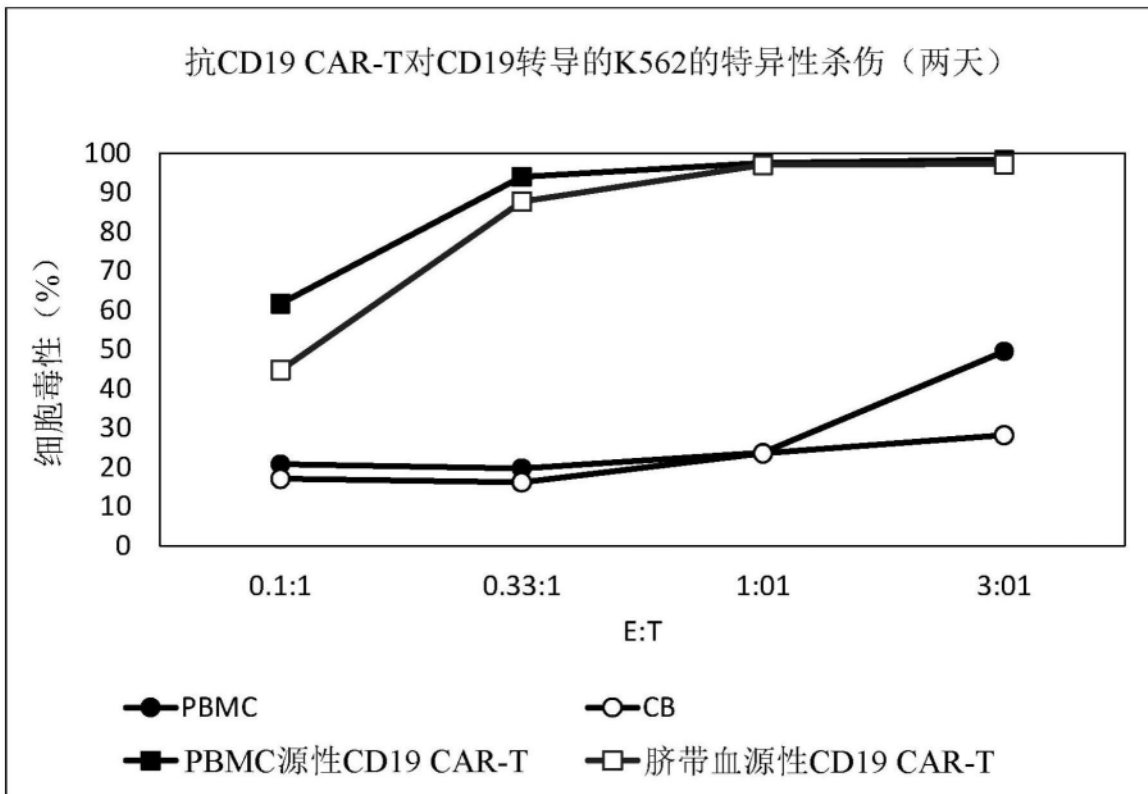


图8

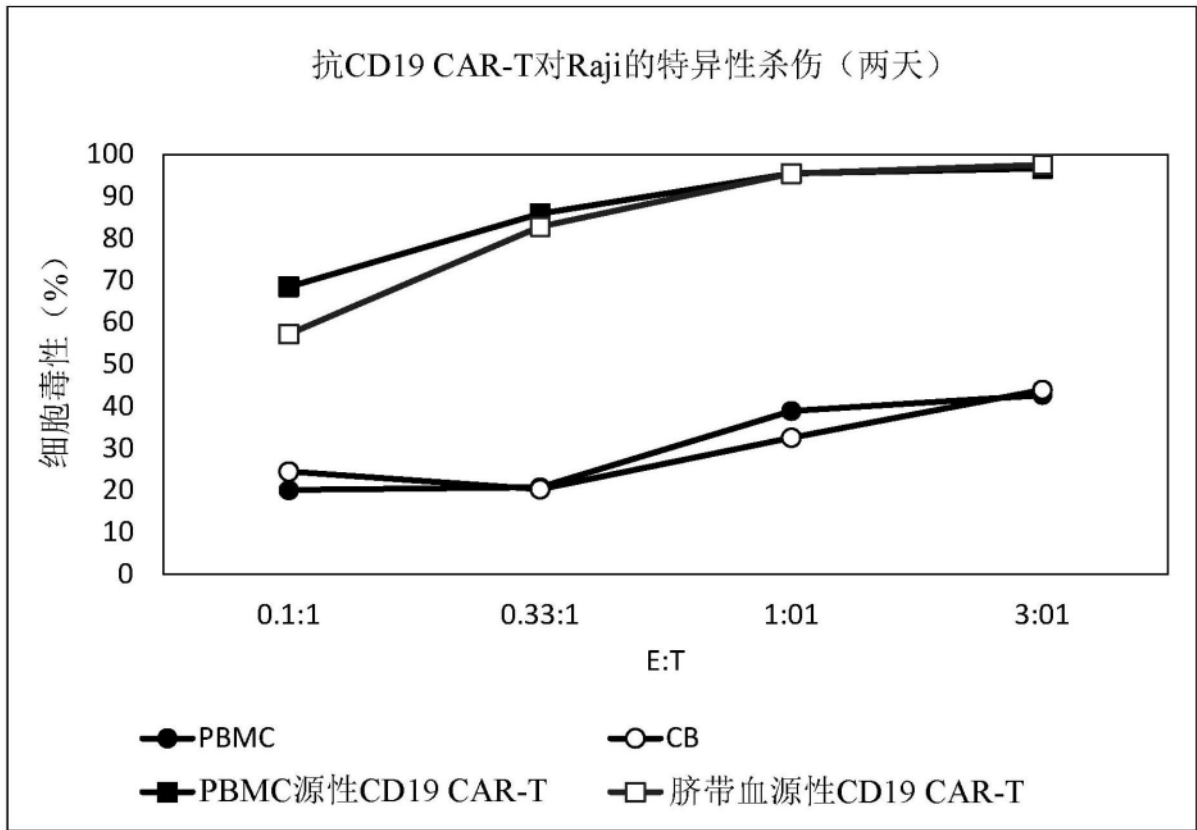


图9

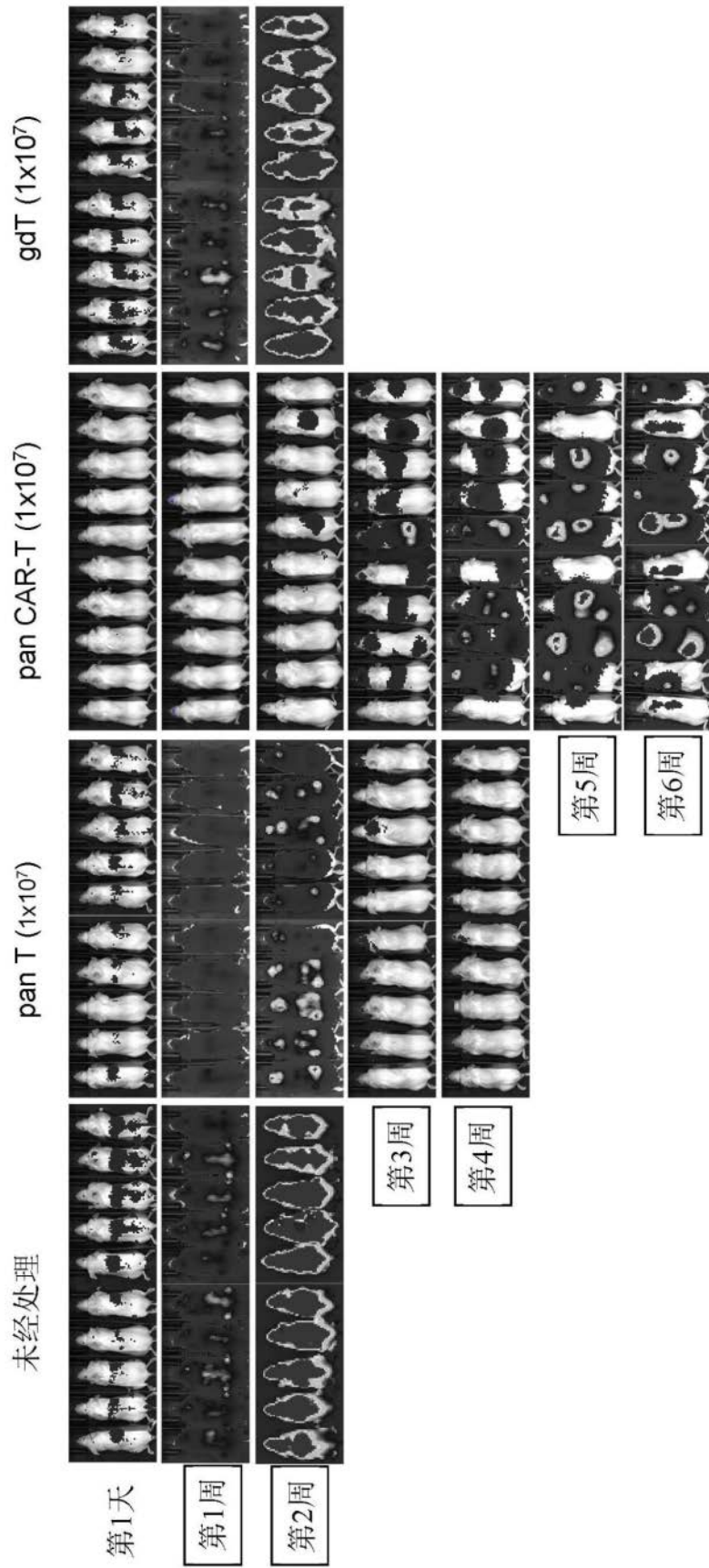


图10A

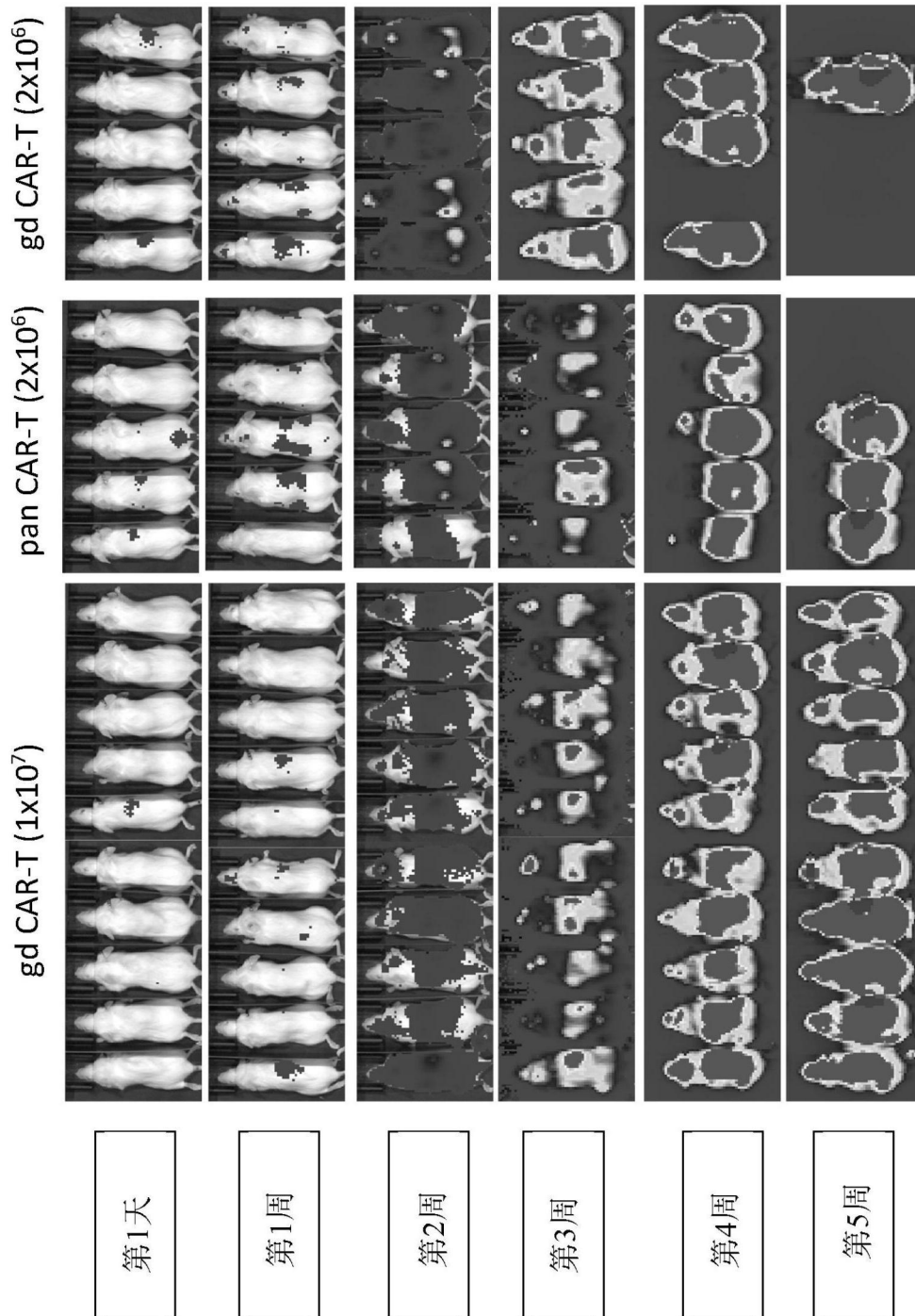


图10B

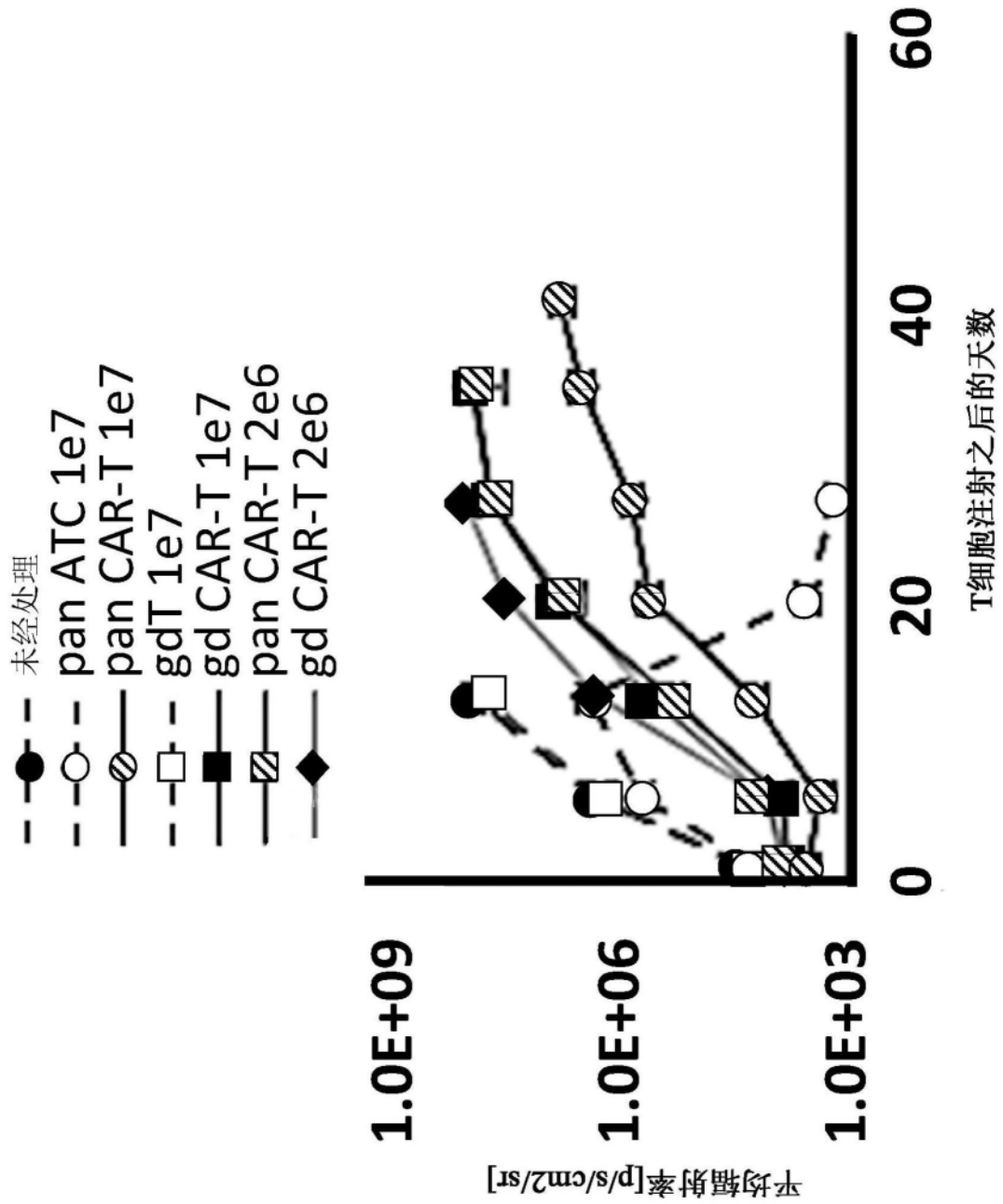


图11A

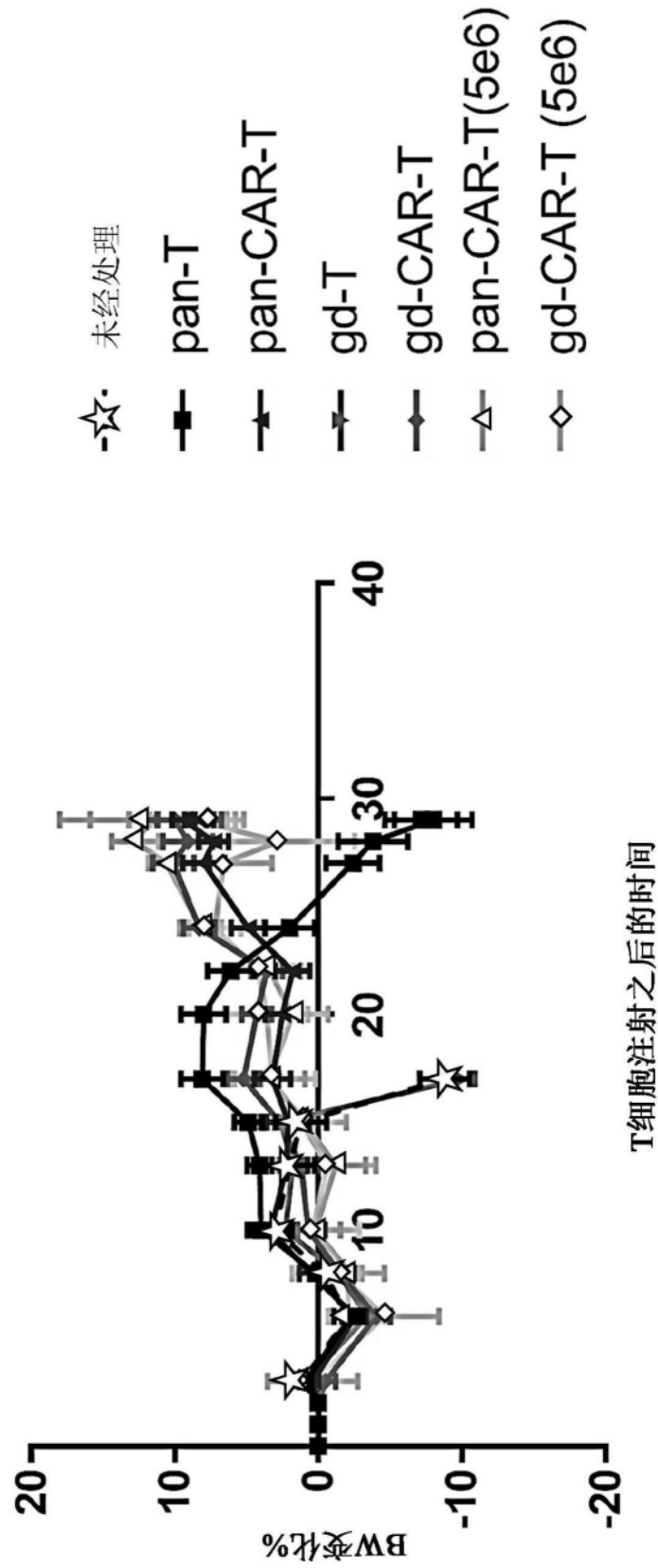


图11B

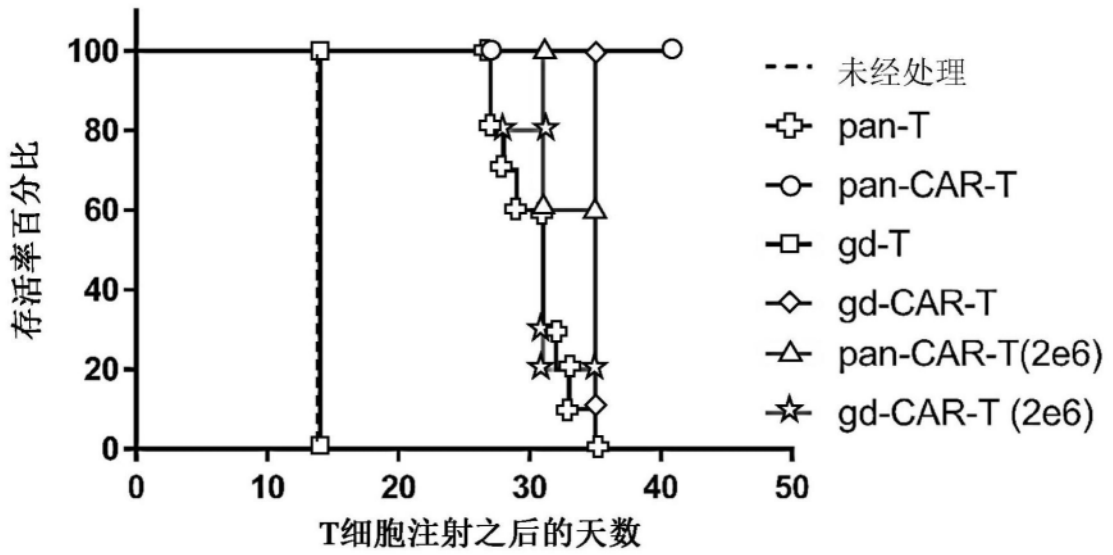


图12A

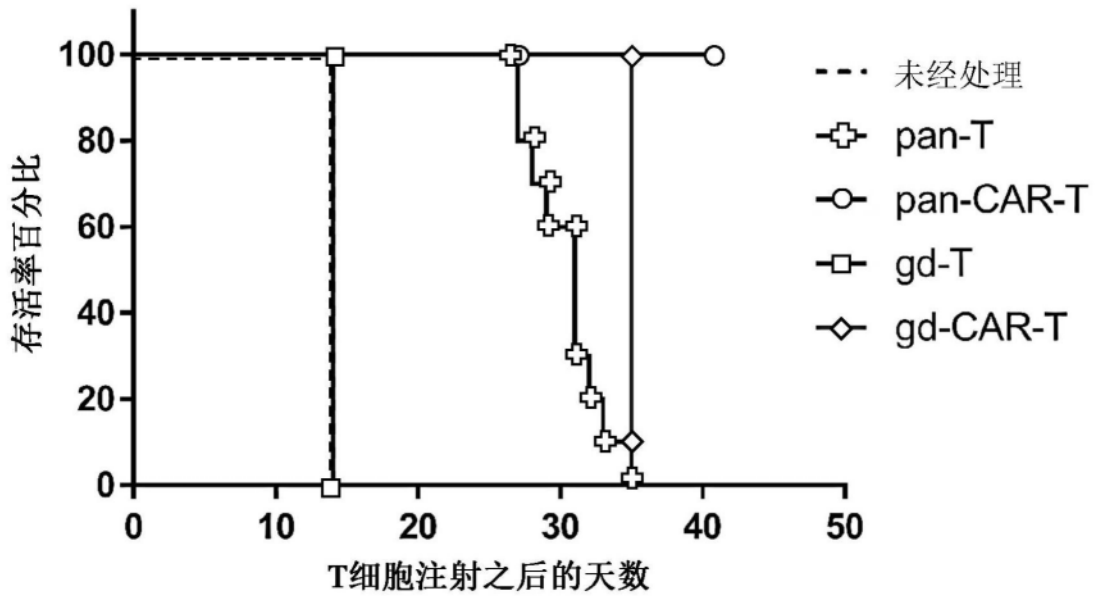


图12B

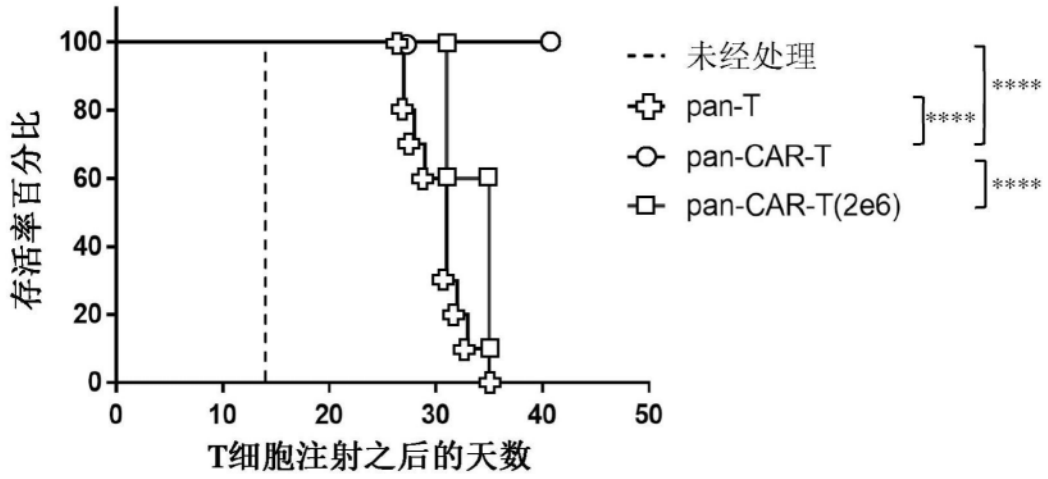


图12C

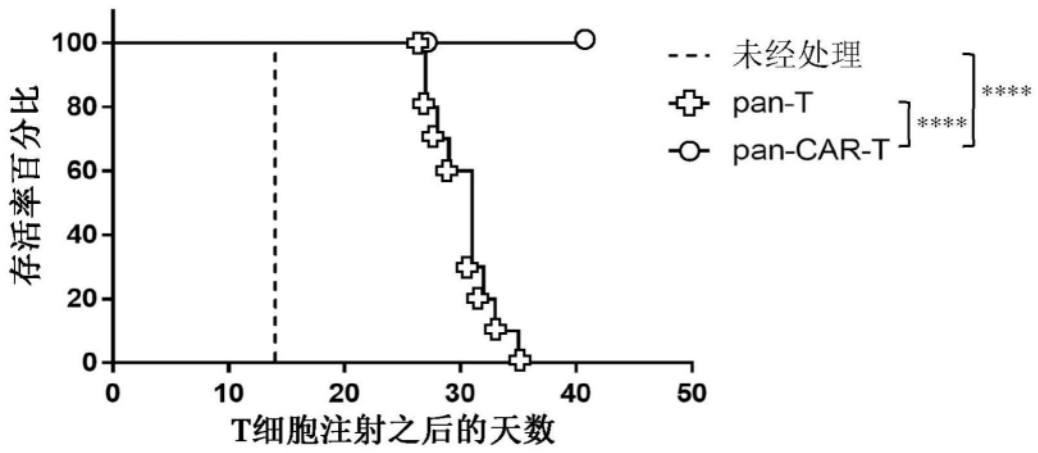


图13A

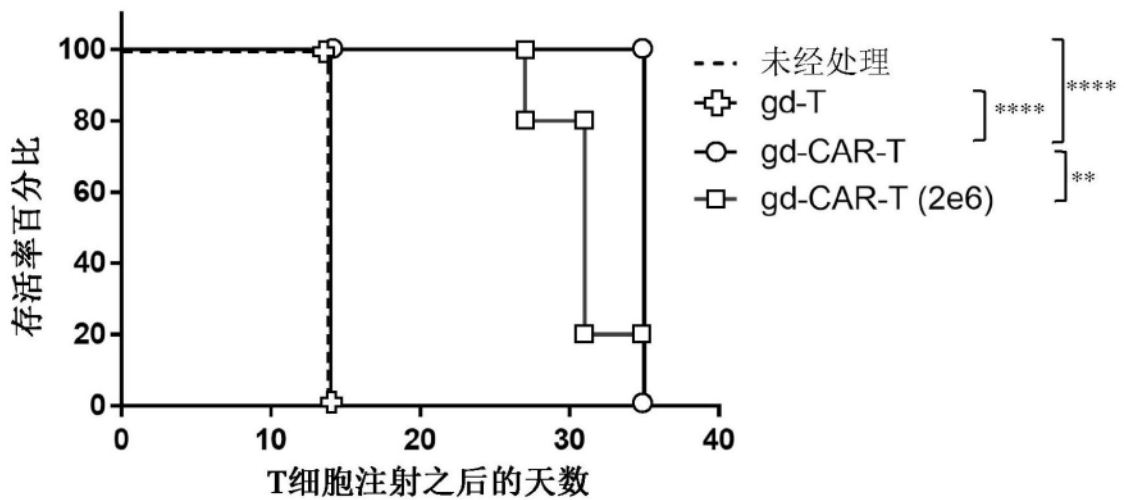


图13B

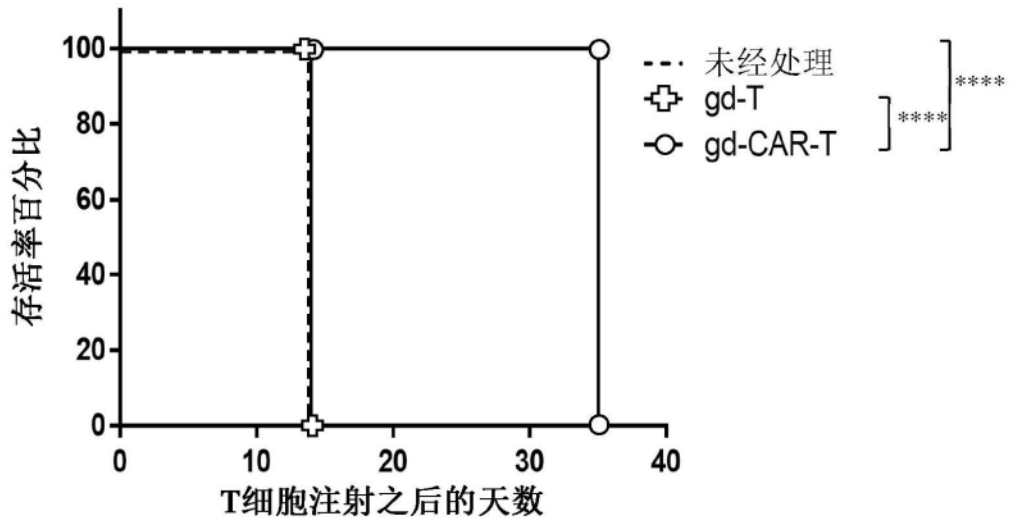


图13C