



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110418802 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201880018507.6

(22)申请日 2018.01.19

(30)优先权数据

62/448,936 2017.01.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/000380 2018.01.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/134691 EN 2018.07.26

(71)申请人 朱诺治疗学有限公司

地址 德国慕尼黑

(72)发明人 L·杰罗姆罗 C·斯坦伯格

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C12N 5/0783(2006.01)

权利要求书14页 说明书134页

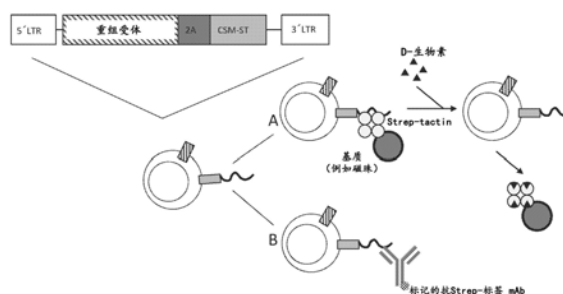
序列表99页 附图2页

## (54)发明名称

细胞表面缀合物及相关的细胞组合物和方法

## (57)摘要

本文提供了含有细胞表面分子和至少一种药剂如至少一种亲和标签的细胞表面缀合物,以及表达此类细胞表面缀合物的工程化细胞。在一些实施方案中,所述细胞表面分子不含有细胞内信号传导结构域或不能介导细胞内信号传导。在一些实施方案中,被工程化以含有所述细胞表面缀合物的细胞如T细胞进一步含有特异性地结合抗原的基因工程化重组受体,如嵌合抗原受体(CAR)。还提供了检测、鉴定、选择或靶向表达所述细胞表面缀合物的细胞的方法,所述方法例如结合制造工程化细胞的方法或结合将此类细胞向受试者的给予,包括过继细胞疗法的方法。



1. 一种细胞表面缀合物,其包含:

(a) 细胞表面分子,所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;以及

(b) 与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂能够结合链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

2. 权利要求1的细胞表面缀合物,其中所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的对链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的结合亲和力。

3. 一种细胞表面缀合物,其包含:

(a) 细胞表面分子,所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;以及

(b) 至少一种药剂,所述至少一种药剂被连接至所述细胞表面分子并且能够可逆地结合试剂和/或能够在竞争物质的存在下被竞争,其中所述药剂是长度为小于50个氨基酸的肽。

4. 权利要求3的细胞表面缀合物,其中所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的对所述试剂的结合亲和力。

5. 权利要求3或权利要求4的细胞表面缀合物,其中所述试剂是链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

6. 一种细胞表面缀合物,其包含:

(a) 细胞表面分子,所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;以及

(b) 与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂具有平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为大于 $10^{-7}$ M或平衡缔合常数 ( $K_A$ ) 为小于 $10^7$ M<sup>-1</sup>的对试剂的结合亲和力。

7. 权利要求6的细胞表面缀合物,其中所述试剂是链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

8. 权利要求1-7中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子包含跨膜结构域和/或能够在所述细胞的表面上表达。

9. 权利要求1-8中任一项的细胞表面缀合物,其中与参考细胞表面分子相比,所述细胞表面分子是经修饰的,任选地其中所述参考细胞表面分子是包含细胞内信号传导结构域的细胞表面受体。

10. 权利要求9的细胞表面缀合物,其中与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

11. 一种细胞表面缀合物,其包含:

(a) 与参考细胞表面分子相比被修饰的细胞表面分子,其中与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合;以及

(b) 与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂能够结合链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

12. 权利要求11的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。

13. 一种细胞表面缀合物,其包含:

(a) 包含前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的细胞表面分子或其经修饰的细胞表面分子; 以及

(b) 与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂, 所述药剂能够结合链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

14. 权利要求13的细胞表面缀合物, 其中:

所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导; 和/或

所述经修饰的细胞表面分子与参考细胞表面分子相比被修饰, 其中与所述参考细胞表面分子相比, 所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

15. 权利要求11-14中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述细胞表面分子包含跨膜结构域和/或能够在所述细胞的表面上表达。

16. 权利要求11-15中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为从或从约 $10^{-4}M$ 至或至约 $10^{-10}M$ 的对链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白的结合亲和力。

17. 权利要求1-16中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述试剂的结合是可逆的和/或能够在竞争物质的存在下被竞争。

18. 权利要求17的细胞表面缀合物, 其中所述竞争物质对所述试剂展现的结合亲和力高于所述药剂对所述试剂展现的结合亲和力。

19. 权利要求18的细胞表面缀合物, 其中:

所述竞争物质展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为在或约在 $10^{-10}M$ 与 $10^{-14}M$ 之间的对所述试剂的结合亲和力; 和/或

所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为大于 $10^{-10}M$ 的对所述试剂的结合亲和力。

20. 权利要求1、2、5、7-20中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白的结合是可逆的和/或能够在生物素、生物素类似物或其生物活性片段的存在下被竞争。

21. 权利要求1-20中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述至少一种药剂直接与所述细胞表面分子连接。

22. 权利要求1-20中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述至少一种药剂经由至少一个接头间接与所述细胞表面分子连接。

23. 权利要求1-22中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述至少一种药剂包含从或从约1种至4种、或1种至2种药剂。

24. 权利要求1-23中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述至少一种药剂仅包含一种药剂。

25. 权利要求1-24中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述细胞表面分子的细胞外部分或区域连接, 任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

26. 权利要求1-25中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂被连接在所述细胞表面分子的N末端。

27. 权利要求1-26中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂被连接在所述细胞表面

分子的C末端。

28. 一种细胞表面缀合物, 所述细胞表面缀合物包含在所述细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子, 所述药剂能够结合作为或包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的试剂, 任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

29. 一种细胞表面缀合物, 所述细胞表面缀合物包含在所述细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子, 所述药剂能够可逆地结合试剂, 其中所述药剂是长度为小于50个氨基酸的肽, 任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

30. 权利要求28或权利要求29的细胞表面缀合物, 其中所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为从或从约 $10^{-4}M$ 至或至约 $10^{-10}M$ 的结合亲和力。

31. 一种细胞表面缀合物, 所述细胞表面缀合物包含在所述细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子, 其中所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为大于 $10^{-7}M$ 或平衡缔合常数 ( $K_A$ ) 为小于 $10^7M^{-1}$ 的对试剂的结合亲和力, 任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

32. 权利要求28-31中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂被连接在所述细胞表面分子的N末端。

33. 权利要求28-31中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂被连接在所述细胞表面分子的C末端。

34. 权利要求28-33中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述试剂是或包含链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

35. 权利要求28-34中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述试剂的结合是可逆的和/或能够在竞争物质的存在下被竞争。

36. 权利要求35的细胞表面缀合物, 其中所述竞争物质对所述试剂展现的结合亲和力高于所述药剂对所述试剂展现的结合亲和力。

37. 权利要求36的细胞表面缀合物, 其中:

所述竞争物质展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为在或约在 $10^{-10}M$ 与 $10^{-14}M$ 之间的对所述试剂的结合亲和力; 和/或

所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为大于 $10^{-10}M$ 的对所述试剂的结合亲和力。

38. 权利要求28、34-37中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白的结合是可逆的和/或能够在生物素或生物素类似物的存在下被竞争。

39. 权利要求28-38中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂直接与所述细胞表面分子连接。

40. 权利要求28-38中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂经由至少一个接头间接与所述细胞表面分子连接。

41. 权利要求28-40中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述细胞表面分子仅与一种药剂连接。

42. 权利要求1-41中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述细胞表面分子不是嵌合抗原

受体 (CAR)。

43. 权利要求28-30中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子与参考细胞表面分子相比是经修饰的。

44. 权利要求43的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;和/或与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

45. 权利要求43或权利要求44的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是天然哺乳动物细胞表面分子。

46. 权利要求1-45中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子包含能够由抗体或其抗原结合片段识别的表位。

47. 权利要求1-33中任一项的细胞表面缀合物,其是融合蛋白。

48. 权利要求1、2、5、7-28和34-47中任一项的细胞表面缀合物,其中参考在SEQ ID NO: 1中所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置,在与位置44至47对应的序列位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。

49. 权利要求1、2、5、7-28和34-48中任一项的细胞表面缀合物,其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

a) 在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列;

b) 如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或

c) a) 或b) 的功能片段,所述功能片段结合所述药剂。

50. 权利要求48或权利要求49的细胞表面缀合物,其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置,在与117、120和/或121对应的位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步包含一个或多个氨基酸置换。

51. 权利要求50的细胞表面缀合物,其中:

所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>;或

所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一个或多个;

或

所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。

52. 权利要求1、2、5、7-28和34-51中任一项的细胞表面缀合物,其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

a) 在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;

b) 如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或

c) a) 或 b) 的功能片段, 所述功能片段结合所述药剂。

53. 权利要求3-5、17-19和35-37中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述竞争物质是或包含生物素、生物素类似物或其生物活性片段。

54. 权利要求1-53中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂是亲和标签。

55. 权利要求3、4、6、8-10、17-19、21-27、29-33、35-37、39-47和54中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂是或包含Strep标签、His标签、Flag标签、Xpress标签、Avi标签、钙调蛋白标签、聚谷氨酸盐标签、HA标签、Myc标签、Nus标签、S标签、X标签、SBP标签、Softag、V5标签、CBP、GST、MBP、GFP、硫氧还蛋白标签或其任何组合。

56. 权利要求1-55中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂是或包含一种或多种链霉亲和素结合肽, 其任选地是Strep标签。

57. 权利要求56的细胞表面缀合物, 其中所述链霉亲和素结合肽包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8) 或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。

58. 权利要求56或权利要求57的细胞表面缀合物, 其中所述药剂包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- (GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- (GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- (GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

59. 权利要求9-58中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述参考细胞表面分子是细胞表面受体、配体、糖蛋白、细胞粘附分子、抗原、整合素或分化簇(CD)。

60. 权利要求59的细胞表面缀合物, 其中所述参考细胞表面分子是细胞表面受体。

61. 权利要求9-60中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述参考细胞表面分子选自EpCAM; VEGFR; 整合素, 任选地整合素 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha IIb\beta 3$ 、 $\alpha 4\beta 7$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 或 $\alpha v$ ; TNF受体超家族的成员, 任选地TRAIL-R1或TRAIL-R2; 表皮生长因子受体家族的成员; PDGF受体; 干扰素受体; 叶酸受体; GPNMB; ICAM-1; HLA-DR; CEA; CA-125; MUC1; TAG-72; IL-6受体; 5T4; GD2; GD3; 前列腺特异性膜抗原(PSMA); 或分化簇细胞表面分子, 任选地CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/基础免疫球蛋白、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5和CD319/SLAMF7。

62. 权利要求9-61中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述参考细胞表面分子是表皮生长因子受体家族的成员。

63. 权利要求9-62中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述参考细胞表面分子是表皮生长因子受体(EGFR)、erbB-2受体酪氨酸蛋白激酶(erbB2, HER2)、erbB-3受体酪氨酸蛋白激酶、erbB-4受体酪氨酸蛋白激酶、肝细胞生长因子受体(HGFR/c-MET)或胰岛素样生长因子受体-1(IGF-1R)。

64. 权利要求9-63中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述参考细胞表面分子是人的。

65. 权利要求9-64中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。

66. 权利要求9-65中任一项的细胞表面缀合物, 其中与所述参考细胞表面分子相比, 所

述经修饰的细胞表面分子被截短以缺乏所述细胞内信号传导结构域或运输结构域的全部或一部分。

67. 权利要求9-66中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

68. 权利要求9-67中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子包含所述参考细胞表面分子的一个或多个细胞外结构域。

69. 权利要求9-68中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子能够结合所述参考细胞表面分子的天然配体和/或底物。

70. 权利要求9-68中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子与所述参考细胞表面分子的天然配体和/或底物的结合减少,或所述经修饰的细胞表面分子不结合所述参考细胞表面分子的天然配体和/或底物。

71. 权利要求70的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子包含所述参考细胞表面分子的至少一个细胞外结构域,但缺乏由所述参考细胞表面分子的天然配体和/或底物识别的一个或多个其他细胞外结构域。

72. 权利要求71的细胞表面缀合物,其中所述至少一个细胞外结构域包含由特异性地结合所述参考细胞表面分子的抗体或其抗原结合片段识别的表位。

73. 权利要求46-72中任一项的细胞表面缀合物,其中所述抗体或抗原结合片段选自AMG-102、AMG-479、BIIB0220A-5D5、CP-751,871、IMC-A12、R1507、3F8、阿巴伏单抗、阿昔单抗、阿德木单抗、阿夫土珠、阿仑单抗、喷替酸阿妥莫单抗、麻安莫单抗、阿泊珠单抗、阿西莫单抗、阿塞珠单抗、阿特殊单抗(=托西珠单抗)、巴利昔单抗、贝妥莫单抗、贝那利珠单抗、贝索单抗、莫比伐珠单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗、莫坎妥珠单抗、卡罗单抗喷地肽、卡妥索单抗、CC49、西利珠单抗、西莫白介素、西妥昔单抗、西妥木单抗、克立昔单抗、泰坦-克利妥珠单抗、CNT0-95、可那木单抗、达西珠单抗、达利珠单抗、达雷木单抗、地莫单抗、依美昔单抗、厄妥索单抗、依决洛单抗、依法利珠单抗、埃罗妥珠单抗、PEG化恩莫单抗、西依匹莫单抗、依帕珠单抗、厄利珠单抗、埃达珠单抗、法索单抗、法拉莫单抗、法勒珠单抗、芬妥木单抗、加利昔单抗、加维莫单抗、吉妥单抗、维汀-格仑妥木单抗、戈利昔单抗、伊巴利珠单抗、替伊莫单抗、伊戈伏单抗、英妥木单抗、伊妥木单抗、伊诺莫单抗、奥英妥珠单抗、伊匹木单抗、凯利昔单抗、拉贝珠单抗、林妥珠单抗、来沙木单抗、鲁卡木单抗、鲁昔单抗、马帕木单抗、马司莫单抗、马妥珠单抗、米拉妥珠单抗、明瑞莫单抗、米妥莫单抗、莫罗单抗-CD3、他那莫单抗、那他株单抗、耐昔妥珠单抗、奥瑞珠单抗、奥度莫单抗、奥法木单抗、奥拉单抗、莫奥珠单抗、奥戈伏单抗、奥昔珠单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、喷妥莫单抗、普立昔单抗、PRO140、尼妥珠单抗、罗妥木单抗、利妥昔单抗、罗维珠单抗、鲁利单抗、沙妥莫单抗喷地肽、西利珠单抗、索土珠单抗、他多赛珠单抗、帕他普莫单抗、替奈昔单抗、特普利珠单抗、TGN1412、替西木单抗(=曲美木单抗)、替加珠单抗、托西珠单抗(=atlizumab)、托利珠单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、曲美木单抗、妥考妥珠单抗、维多株单抗、维妥珠单抗、维西珠单抗、vitaxin、伏洛昔单抗、伏妥莫单抗、扎鲁木单抗、扎木单抗、齐拉木单抗、阿佐莫单抗、阿特殊单抗、贝伐珠单抗(Avastin®)、地诺单抗、地努图希单抗、纳武单抗、奥滨尤妥珠单抗、派姆单抗、皮地利珠单抗(CT-011)、雷莫芦单抗、司妥昔单抗、曲妥珠单抗-美坦新偶联物、CEA-scan Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C、

MEDI4736、或其抗原结合片段。

74. 权利要求9-73中任一项的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是参考EGFR,并且所述经修饰的细胞表面分子是经修饰的EGFR。

75. 权利要求74的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR包含由西妥昔单抗或其抗原结合片段特异性识别的表位。

76. 权利要求74或权利要求75的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR缺乏所述参考EGFR的EGFR结构域I、EGFR结构域II、EGFR近膜结构域和EGFR酪氨酸激酶结构域中的一个或多个。

77. 权利要求74-76中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR缺乏所述参考EGFR的EGFR结构域I、EGFR结构域II、EGFR近膜结构域和EGFR酪氨酸激酶结构域中的全部结构域。

78. 权利要求74-77中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR包含细胞外结构域,所述细胞外结构域由所述参考EGFR的亚结构域III和亚结构域IV组成或基本上由其组成。

79. 权利要求74-78中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR包含在SEQ ID NO:44或46中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:44或46至少或至少约85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。

80. 权利要求9-73中任一项的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是参考HER2,并且所述经修饰的细胞表面分子是经修饰的HER2。

81. 权利要求80的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2包含由曲妥珠单抗或其抗原结合片段特异性识别的表位。

82. 权利要求80或权利要求81的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2缺乏所述参考HER2的HER2结构域I、HER2结构域II、HER2结构域III中的一个或多个。

83. 权利要求80-82中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2缺乏所述参考HER2的HER2结构域I、HER2结构域II和HER2结构域III中的全部结构域。

84. 权利要求80-83中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2包含细胞外结构域,所述细胞外结构域由所述参考HER2的结构域IV组成或基本上由其组成。

85. 权利要求80-84中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2包含在SEQ ID NO:92中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:92至少或至少约85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。

86. 权利要求9-72中任一项的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是参考PSMA,并且所述经修饰的细胞表面分子是经修饰的PSMA。

87. 权利要求86的细胞表面缀合物,其中所述参考PSMA是野生型PSMA,任选地野生型人PSMA。

88. 权利要求87的细胞表面缀合物,其中所述参考PSMA是人PSMA和/或包含SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:96或97中所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

89. 权利要求86-88中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的PSMA包含所述参考PSMA的细胞外部分和跨膜结构域。

90. 权利要求86-89中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考PSMA相比,所述经修



饰的PSMA在所述细胞内区域中包含一个或多个氨基酸修饰。

91. 权利要求86-90中任一项的细胞表面缀合物,其中所述一个或多个氨基酸修饰包含一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。

92. 权利要求86-91中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考PSMA相比,所述经修饰的PSMA展现改变的细胞内化。

93. 权利要求86-92中任一项的细胞表面缀合物,其中参考在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列中的位置,所述经修饰的PSMA包含与W2G对应的氨基酸取代或者不包含W2或者不包含在位置2处的任何残基。

94. 权利要求86-93中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考PSMA相比,所述经修饰的PSMA包含11个N末端氨基酸的缺失或截短。

95. 权利要求86-94中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的PSMA包含能够由抗体或其抗原结合片段识别的表位。

96. 权利要求95的细胞表面缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段选自J591、DF0-J591、CYT-356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107-1A4、YPSMA-1、YPSMA-2、3E6、2G7、24.4E6、GCP-02、GCP-04、GCP-05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7-Fc、D7-CH3、4D4、A5、及其抗原结合片段。

97. 权利要求1-96中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面缀合物不是免疫原性的和/或在给予它的受试者中不诱导免疫应答。

98. 一种多核苷酸,其包含编码权利要求1-97中任一项的细胞表面缀合物的核酸序列。

99. 权利要求98的多核苷酸,其中所述核酸序列进一步包含信号序列。

100. 权利要求99的多核苷酸,其中所述信号序列编码源自GMCSFR $\alpha$ 链的信号肽。

101. 权利要求98-100中任一项的多核苷酸,其中所述核酸序列是第一核酸序列,并且所述多核苷酸进一步包含编码重组受体的第二核酸序列。

102. 权利要求101的多核苷酸,其中所述重组受体是或包含嵌合抗原受体(CAR)。

103. 权利要求101或权利要求102的多核苷酸,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列被内部核糖体进入位点(IRES)或者编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分开,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

104. 权利要求101-103中任一项的多核苷酸,其中所述第一核酸序列在所述第二核酸序列的上游。

105. 权利要求101-103中任一项的多核苷酸,其中所述第一核酸序列在所述第二核酸序列的下游。

106. 一种载体,其包含权利要求98-105中任一项的多核苷酸。

107. 权利要求106的载体,其是病毒载体。

108. 权利要求106或权利要求107的载体,其是逆转录病毒载体。

109. 权利要求106-108中任一项的载体,其是慢病毒载体或 $\gamma$ 逆转录病毒载体。

110. 一种产生工程化细胞的方法,所述方法包括将权利要求96-105中任一项的多核苷酸或权利要求106-109中任一项的载体引入细胞中。

111. 一种工程化细胞,其通过权利要求110的方法产生。

112. 一种工程化细胞,其包含权利要求98-105中任一项的多核苷酸或权利要求106-

109中任一项的载体。

113. 一种工程化细胞,其包含权利要求1-97中任一项的细胞表面缀合物。

114. 权利要求113的工程化细胞,其进一步包含:重组受体。

115. 权利要求114的工程化细胞,其中所述重组受体能够结合靶抗原,所述靶抗原与疾病或障碍的细胞或组织相关、对疾病或障碍的细胞或组织是特异的和/或在疾病或障碍的细胞或组织上表达。

116. 权利要求115的工程化细胞,其中所述疾病或障碍是感染性疾病或障碍、自身免疫性疾病、炎性疾病、或肿瘤或癌症。

117. 权利要求115或权利要求116的工程化细胞,其中所述靶抗原是肿瘤抗原。

118. 权利要求115-117中任一项的工程化细胞,其中所述靶抗原选自 $\alpha v\beta 6$ 整合素( $\alpha v\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CC基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、III型表皮生长因子受体突变(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 $\alpha$ 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 $\alpha$ (IL-22Ra)、IL-13受体 $\alpha 2$ (IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 $\kappa$ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、天然杀伤组2成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Wilms肿瘤1(WT-1)。

119. 权利要求115-118中任一项的工程化细胞,其中所述靶抗原选自ROR1、HER2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha 2$ 、kdr、 $\kappa$ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)和细胞周期蛋白A1(CCNA1)。

120. 权利要求114-119中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。

121. 权利要求114-120中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体是嵌合抗原受体

(CAR)。

122. 权利要求114-121中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体包含含有抗原结合结构域的细胞外部分。

123. 权利要求122的工程化细胞,其中所述抗原结合结构域是或包含抗体或抗体片段。

124. 权利要求123的工程化细胞,其中所述抗体片段是单链片段。

125. 权利要求123或权利要求124的工程化细胞,其中所述片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。

126. 权利要求123-125中任一项的工程化细胞,其中所述片段包含scFv。

127. 权利要求114-126中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体包含细胞内信号传导区域。

128. 权利要求127的工程化细胞,其中所述细胞内信号传导区域包含细胞内信号传导结构域。

129. 权利要求128的工程化细胞,其中所述细胞内信号传导结构域是或包含主要信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体 (TCR) 组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导结构域。

130. 权利要求128或权利要求129的工程化细胞,其中所述细胞内信号传导结构域是或包含CD3链的细胞内信号传导结构域,任选地CD3-zeta (CD3 $\zeta$ ) 链或其信号传导部分。

131. 权利要求127-130中任一项的工程化细胞,其进一步包含设置在所述细胞外结构域与所述细胞内信号传导区域之间的跨膜结构域。

132. 权利要求127-131中任一项的工程化细胞,其中所述细胞内信号传导区域进一步包含共刺激信号传导结构域。

133. 权利要求132的工程化细胞,其中所述共刺激信号传导结构域包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

134. 权利要求132或权利要求133的工程化细胞,其中所述共刺激信号传导结构域包含CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

135. 权利要求132-134中任一项的工程化细胞,其中所述共刺激信号传导结构域位于所述跨膜结构域与所述细胞内信号传导结构域之间。

136. 权利要求111-135中任一项的工程化细胞,其中所述细胞是免疫细胞。

137. 权利要求136的工程化细胞,其中所述细胞是淋巴细胞。

138. 权利要求111-137中任一项的工程化细胞,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

139. 权利要求138的工程化细胞,其中所述细胞是T细胞,所述T细胞是CD8<sup>+</sup>T细胞或CD4<sup>+</sup>T细胞。

140. 一种组合物,其包含权利要求111-139中任一项的工程化细胞。

141. 权利要求140的组合物,其进一步包含药学上可接受的赋形剂。

142. 一种治疗方法,其包括将权利要求111-139中任一项的工程化细胞或权利要求140或权利要求141的组合物给予至患有疾病或障碍的受试者。

143. 权利要求142的方法,其中所述疾病或障碍是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或障碍、或感染性疾病。

144. 权利要求142或权利要求143的方法,其进一步包括向所述受试者给予结合分子,

所述结合分子能够识别在所述工程化细胞上表达的所述细胞表面缀合物的所述药剂;并且检测表达所述细胞表面缀合物的细胞。

145. 权利要求144的方法,其中检测包括体内成像。

146. 一种鉴定表达细胞表面缀合物的细胞的方法,所述方法包括使包含表达或可能表达权利要求1-97中任一项的细胞表面缀合物的细胞或权利要求111-139中任一项的工程化细胞的组合物、或权利要求140或权利要求141的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的所述药剂的结合分子接触。

147. 权利要求146的方法,其在体外、离体或在体内进行。

148. 权利要求146或权利要求147中任一项的方法,其中经由体内成像来检测表达所述细胞表面分子的细胞。

149. 权利要求145或权利要求148的方法,其中所述体内成像方法选自磁共振成像(MRI)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、计算机断层扫描(CT)、计算机轴向断层扫描(CAT)、电子束计算机断层扫描(EBCT)、高分辨率计算机断层扫描(HRCT)、内摆线断层扫描、正电子发射断层扫描(PET)、闪烁扫描、 $\gamma$ 照相机、 $\beta^+$ 检测器、 $\gamma$ 检测器、荧光成像、低光成像、X射线和生物发光成像。

150. 权利要求145、权利要求148或权利要求149的方法,其中所述结合分子与提供信号或诱导在体内可检测的信号的部分缀合。

151. 权利要求150的方法,其中所述部分是放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物或酶。

152. 一种鉴定用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括:

(a) 使得用编码所述细胞表面缀合物的权利要求98-105中任一项的多核苷酸或权利要求106-109中任一项的载体转导的组合物、或权利要求111-139中任一项的工程化细胞、或权利要求140或权利要求141的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触;并且

(b) 鉴定与所述结合分子结合的细胞。

153. 一种鉴定用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括:

(a) 将编码所述细胞表面缀合物的权利要求98-105中任一项的多核苷酸或权利要求106-109中任一项的载体引入细胞中;

(b) 使包含(a)的所述细胞的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的所述药剂的结合分子接触;并且

(c) 鉴定所述组合物的与所述结合分子结合的细胞。

154. 一种选择用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括:

(a) 使得用编码所述细胞表面缀合物的权利要求98-105中任一项的多核苷酸或权利要求106-109中任一项的载体转导的组合物、或权利要求111-139中任一项的工程化细胞、或权利要求140或权利要求141的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触;并且

(b) 分离与所述结合分子结合的细胞。

155. 一种选择用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括:

(a) 将编码所述细胞表面缀合物的权利要求98-105中任一项的多核苷酸或权利要求

106-109中任一项的载体引入细胞中；

(b) 使包含(a)的所述细胞的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的所述药剂的结合分子接触；并且

(c) 分离所述组合物的与所述结合分子结合的细胞。

156. 权利要求154或权利要求155的方法，其中所述结合分子与可检测部分缀合或能够产生可检测的信号。

157. 权利要求156的方法，其中所述可检测部分包含荧光蛋白。

158. 权利要求144-157中任一项的方法，其中所述药剂是链霉亲和素结合肽。

159. 权利要求158的方法，其中所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8) 或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。

160. 权利要求159的方法，其中所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

161. 权利要求144-160中任一项的方法，其中所述结合分子是能够可逆地结合所述药剂和/或能够在竞争物质的存在下被竞争的试剂。

162. 权利要求161的方法，其中所述试剂是链霉亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白。

163. 权利要求162的方法，其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置，在与位置44至47对应的序列位置处，所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。

164. 权利要求162或权利要求163的方法，其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含：

a) 在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列；

b) 如下氨基酸序列，所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂；或

c) a) 或b) 的功能片段，所述功能片段结合所述药剂。

165. 权利要求163或权利要求164的方法，其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置，在与117、120和/或121对应的位置处，所述链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步包含一个或多个氨基酸置换。

166. 权利要求165的方法，其中：

所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>；或

所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一个或多个；

或

所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。

167. 权利要求162-166中任一项的方法,其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

a) 在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;

b) 如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或

c) a) 或b) 的功能片段,所述功能片段结合所述药剂。

168. 权利要求161-167中任一项的方法,其进一步包括破坏所述结合分子与所述药剂的可逆结合。

169. 权利要求168的方法,其中所述破坏包括使所述细胞与包含能够逆转所述结合分子与所述药剂之间的键的竞争物质的组合物接触。

170. 权利要求169的方法,其中所述竞争物质是游离结合配偶体和/或是竞争剂。

171. 权利要求169或权利要求170的方法,其中所述竞争物质是或包含生物素、生物素类似物或其生物活性片段。

172. 权利要求144-171中任一项的方法,其中所述结合分子是特异性结合所述药剂的抗体或抗原结合片段。

173. 权利要求172的方法,其中所述结合分子是抗Strep标签抗体。

174. 一种分子,其包含与细胞毒性剂缀合的链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白。

175. 权利要求174的分子,其包含链霉亲和素类似物或突变蛋白。

176. 权利要求174或权利要求175的方法,其中所述链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白与链霉亲和素结合肽结合。

177. 权利要求176的分子,其中所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8) 或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。

178. 权利要求176或权利要求177的方法,其中所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

179. 权利要求176-178中任一项的分子,其中所述链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白展现平衡解离常数(K<sub>D</sub>)为从或从约10<sup>-4</sup>M至或至约10<sup>-10</sup>M的对所述链霉亲和素结合肽的结合亲和力。

180. 权利要求174-179中任一项的分子,其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置,在与位置44至47对应的序列位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。

181. 权利要求174-180中任一项的分子,其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

a) 在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列;

b) 如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或

c) a) 或b) 的功能片段,所述功能片段结合所述链霉亲和素结合肽。

182. 权利要求180或权利要求181的方法,其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置,在与117、120和/或121对应的位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步包含一个或多个氨基酸置换。

183. 权利要求182的分子,其中:

所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>;或

所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一个或多个;

或

所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。

184. 权利要求174-183中任一项的分子,其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

a) 在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;

b) 如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或

c) a) 或b) 的功能片段,所述功能片段可逆地结合所述链霉亲和素结合肽。

185. 权利要求174-184中任一项的分子,其中所述细胞毒性剂是毒素。

186. 权利要求185的分子,其中所述毒素是肽毒素、蓖麻毒素A链毒素、相思豆毒素A链、白喉毒素(DT) A链、假单胞菌外毒素、志贺毒素A链、白树毒素、苦瓜毒蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、皂草素、天花粉蛋白或大麦毒素。

187. 权利要求185的分子,其中所述毒素是光毒素。

188. 一种杀伤细胞的方法,所述方法包括将权利要求174-187中任一项的分子给予至先前给予过权利要求111-139中任一项的细胞、或权利要求140或权利要求141的组合物的受试者。

189. 权利要求188的方法,其中在所述受试者展现与所给予的细胞相关的毒性结果的时候或在所述受试者展现针对所给予的细胞的可检测的和/或细胞介导的免疫应答的时候给予所述分子。

190. 权利要求189的方法,其中所述毒性结果与神经毒性或细胞因子释放综合征(CRS)相关。

## 细胞表面缀合物及相关的细胞组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年1月20日提交的标题为“细胞表面缀合物及相关的细胞组合物和方法 (CELL SURFACE CONJUGATES AND RELATED CELL COMPOSITIONS AND METHODS)”的美国临时申请号62/448,936的优先权,将其内容通过引用以其全文并入。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 本申请是与电子格式的序列表一起提交申请的。序列表以2018年1月19日创建的名为735042002640SeqList.TXT的文件提供,其大小为209,044字节。将在电子格式的序列表中的信息通过引用以其全文并入。

### 技术领域

[0005] 本发明的公开文本在一些方面涉及含有细胞表面分子和至少一种药剂(如至少一种亲和和标签)的细胞表面缀合物,以及表达此类细胞表面缀合物的工程化细胞。在一些实施方案中,所述细胞表面分子不含有细胞内信号传导结构域或不能介导细胞内信号传导。在一些实施方案中,被工程化以含有细胞表面缀合物的细胞(如T细胞),进一步含有与抗原特异性结合的基因工程化重组受体(如嵌合抗原受体)。本公开文本还提供了检测、鉴定、选择或靶向表达细胞表面缀合物的细胞的方法,例如结合制造工程化细胞的方法或结合将此类细胞向受试者的给予(包括过继细胞疗法的方法)。

### 背景技术

[0006] 各种策略可用于治疗疾病或病症(如癌症或肿瘤),包括给予细胞疗法。此外,策略可用于将免疫细胞工程化以表达基因工程化重组受体如嵌合抗原受体(CAR),以及向受试者给予含有此类细胞的组合物。需要改进的策略,例如,通过在给予至受试者时结合此类疗法来改善工程化组合物和/或改善监测或调节工程化组合物的能力,来增加治疗功效。提供了满足此类需求的组合物、细胞和方法。

### 发明内容

[0007] 本文提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导的细胞表面分子;以及与细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂能够结合链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白。在一些实施方案中,所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的对链霉亲和素或者链霉亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白的结合亲和力。

[0008] 还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导的细胞表面分子;以及与细胞表面分子连接并且能够可逆地结合试剂和/或能够在竞争物质的存在下竞争结合所述试剂的至少一种药剂,其中所述药剂是长度为小于50个氨基酸的肽。在一些实施方案中,所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的对所述试剂的结合亲和力。在一些任何此类实施



方案中,所述试剂是链霉亲和素或者链霉亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白。

[0009] 在一些实施方案中,所述细胞表面分子包含跨膜结构域和/或能够在细胞表面上表达。在一些实施方案中,与参考细胞表面分子相比,所述细胞表面分子是经修饰的,任选地其中所述参考细胞表面分子是包含细胞内信号传导结构域的细胞表面受体。在一些实施方案中,与所述参考细胞表面分子相比,经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

[0010] 还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有(a)与参考细胞表面分子相比被修饰的细胞表面分子,其中与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合;以及(b)与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂能够结合链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

[0011] 在一些实施方案中,所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有(a)包含前列腺特异性膜抗原(PSMA)的细胞表面分子或其经修饰的细胞表面分子;以及(b)与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂能够结合链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。在一些实施方案中,所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;和/或与参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子被修饰,其中与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。在一些实施方案中,所述细胞表面分子包含跨膜结构域和/或能够在细胞表面上表达。在一些实施方案中,所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为从或从约 $10^{-4}M$ 至或至约 $10^{-10}M$ 的对链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白的结合亲和力。

[0012] 本文提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导的细胞表面分子;以及与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂具有平衡解离常数( $K_D$ )为大于 $10^{-7}M$ 或平衡缔合常数( $K_A$ )为小于 $10^7M^{-1}$ 的对试剂的结合亲和力。在一些情形中,所述试剂是链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白。

[0013] 在任何所提供的实施方案中,所述细胞表面分子是细胞表面蛋白。

[0014] 在一些任何此类实施方案中,所述药剂与所述试剂的结合是可逆的和/或能够在竞争物质的存在下竞争结合所述试剂。在一些方面,所述竞争物质对所述试剂展现的结合亲和力高于所述药剂对所述试剂展现的结合亲和力。在一些实施方案中,所述竞争物质展现平衡解离常数( $K_D$ )在或约在 $10^{-10}M$ 与 $10^{-14}M$ 之间的对所述试剂的结合亲和力;和/或所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为大于 $10^{-10}M$ 的对所述试剂的结合亲和力。

[0015] 在一些任何此类实施方案中,所述药剂与链霉亲和素或者链霉亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白的结合是可逆的和/或能够在生物素、生物素类似物或其生物活性片段的存在下竞争结合所述试剂。

[0016] 在一些任何此类实施方案中,所述至少一种药剂直接与细胞表面分子连接。在一些任何此类实施方案中,所述至少一种药剂经由至少一个接头间接地与细胞表面分子连接。

[0017] 在一些方面,含有所述细胞表面分子以及所述至少一种药剂(例如肽,如链霉亲和

素结合肽)的所述细胞表面缀合物是融合蛋白。

[0018] 在一些任何此类实施方案中,所述至少一种药剂包括从或从约1至4种或者从或从约1至2种药剂。在一些任何此类实施方案中,所述至少一种药剂是仅一种药剂。在一些任何此类实施方案中,所述药剂与所述细胞表面分子的细胞外部分或区域连接,任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。在一些任何此类实施方案中,所述药剂被连接在所述细胞表面分子的N末端。在一些任何此类实施方案中,所述药剂被连接在所述细胞表面分子的C末端。

[0019] 还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有细胞表面分子(如细胞表面蛋白),所述细胞表面分子在其N末端与药剂连接,所述药剂能够结合作为或含有链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的试剂。

[0020] 还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有细胞表面分子(如细胞表面蛋白),所述细胞表面分子在其N末端与能够可逆地结合试剂的药剂连接,其中所述药剂是长度为小于50个氨基酸的肽。

[0021] 在一些任何此类实施方案中,所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为从或从约 $10^{-4}$ 至 $10^{-10}$ M的对试剂(例如,作为或含有链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白的试剂)的结合亲和力。

[0022] 还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物包含在细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子,所述药剂能够结合作为或包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的试剂,任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

[0023] 还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物包含在细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子,所述药剂能够可逆地结合所述试剂,其中所述药剂是长度为小于50个氨基酸的肽,任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。在一些实施方案中,所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的结合亲和力。

[0024] 还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物包含在所述细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子,其中所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为大于 $10^{-7}$ M或平衡缔合常数( $K_A$ )为小于 $10^7$ M $^{-1}$ 的对试剂的结合亲和力,任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。在一些实施方案中,所述药剂被连接在所述细胞表面分子的N末端。在一些实施方案中,所述药剂被连接在所述细胞表面分子的C末端。

[0025] 还提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有在细胞表面分子的N末端与药剂连接的细胞表面分子(如细胞表面蛋白),其中所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为大于 $10^{-7}$ M或平衡缔合常数( $K_A$ )为小于 $10^7$ M $^{-1}$ 的对试剂的结合亲和力。在一些任何此类实施方案中,所述试剂是或含有链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白。

[0026] 在一些任何此类实施方案中,所述药剂与所述试剂(例如作为或含有链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白的试剂)的结合是可逆的和/或能够在竞争物质的存在下竞争结合所述试剂。在一些情况下,所述竞争物质对所述试剂展现的结合亲和力高于所述药剂对所述试剂展现的结合亲和力。在一些例子中,竞争物质展现在或约在 $10^{-10}$ 与 $10^{-14}$ 之

间的对试剂的结合亲和力;和/或所述药剂展现小于 $10^{-10}$ 的对所述试剂的结合亲和力。在一些任何此类实施方案中,所述试剂是链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白,并且所述药剂与链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白的结合是可逆的和/或能够在生物素或生物素类似物的存在下竞争结合所述试剂。

[0027] 在一些任何此类实施方案中,所述药剂直接地与所述细胞表面分子连接,如与细胞表面蛋白连接,包括与如所描述的经修饰的细胞表面分子连接。在一些任何此类实施方案中,所述药剂经由至少一个接头间接地与细胞表面分子连接。在一些任何此类实施方案中,所述细胞表面分子如细胞表面蛋白与仅一种药剂连接。

[0028] 在一些任何此类实施方案中,所述细胞表面分子不是嵌合抗原受体(CAR)。

[0029] 在一些任何此类实施方案中,所述细胞表面分子如细胞表面蛋白缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。在一些任何此类实施方案中,与参考细胞表面分子相比,所述细胞表面分子是经修饰的。在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面分子是天然哺乳动物细胞表面分子。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的细胞表面分子包含或保留所述参考细胞表面分子的表位,所述表位能够由抗体或其抗原结合片段识别。在一些实施方案中,所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;和/或与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

[0030] 在一些任何此类实施方案中,所述细胞表面缀合物是融合蛋白。

[0031] 在一些任何此类实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与位置44至47对应的序列位置处,链霉亲和素类似物或突变蛋白含有氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。在一些任何此类实施方案中,链霉亲和素类似物或突变蛋白含有a)在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列;b)如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或c) a)或b)的功能片段,所述功能片段可逆地结合所述药剂和/或其中在竞争物质的存在下竞争结合所述药剂。

[0032] 在一些任何此类实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与117、120和/或121对应的位置处,链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步含有一个或多个氨基酸置换。在一些方面,所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>;或者所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一种或多种;或者所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。

[0033] 在一些任何此类实施方案中,链霉亲和素类似物或突变蛋白含有a)在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;b)如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列,并且可逆地结合所述药剂和/或在其中在竞争物质的存在下竞争结合所述药剂;或c) a)或b)的功能片段,所述功能片段可逆地结合所述药剂和/或其中在

竞争物质的存在下竞争结合所述药剂。

[0034] 在一些任何此类实施方案中,所述药剂是亲和标签。在一些任何此类实施方案中,所述药剂是或含有Strep标签、His标签、Flag标签、Xpress标签、Avi标签、钙调蛋白(Calmodulin)标签、聚谷氨酸盐(Polyglutamate)标签、HA标签、Myc标签、Nus标签、S标签、X标签、SBP标签、Softag、V5标签、CBP、GST、MBP、GFP、硫氧还蛋白(Thioredoxin)标签或其任何组合。在一些任何此类实施方案中,所述药剂是或包含一种或多种链霉亲和素结合肽,其任选地是Strep标签。

[0035] 在一些任何此类实施方案中,链霉亲和素结合肽含有序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8) 或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。

[0036] 在一些任何此类实施方案中,所述药剂含有序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0037] 在一些任何此类实施方案中,竞争物质是或含有生物素、生物素类似物或其生物活性片段。此类实施方案包括其中所述药剂是链霉亲和素结合肽并且所述试剂是链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或类似物(包括如所描述的任一种)的那些实施方案。

[0038] 在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面分子是细胞表面蛋白,所述细胞表面蛋白是细胞表面受体、配体、糖蛋白、细胞粘附分子、抗原、整合素或分化簇(CD)。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是细胞表面受体。在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面分子选自EpCAM、VEGFR、整合素(例如,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_4\beta_7$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v$ )、TNF受体超家族的成员(例如,TRAIL-R1、TRAIL-R2)、表皮生长因子受体家族的成员、PDGF受体、干扰素受体、叶酸受体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受体、5T4、GD2、GD3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、或分化簇(例如,CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/基础免疫球蛋白(basigin)、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5和CD319/SLAMF7)。

[0039] 在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面分子(如参考细胞表面蛋白)是表皮生长因子受体家族的成员。在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面分子是表皮生长因子受体(EGFR)、erbB-2受体酪氨酸蛋白激酶(erbB2,HER2)、erbB-3受体酪氨酸蛋白激酶、erbB-4受体酪氨酸蛋白激酶、肝细胞生长因子受体(HGFR/c-MET)或胰岛素样生长因子受体-1(IGF-1R)。在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面分子是前列腺特异性膜抗原(PSMA)。

[0040] 在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面分子(如参考细胞表面蛋白)是人的。

[0041] 在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。在一些任何此类实施方案中,与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子被截短,例如被截短以除去或缺失细胞内区域的全部或一部分,即所述参考细胞表面分子的包含在细胞内部的分子的一部分。在一些情

况下,细胞内区域是含有细胞内信号传导结构域或运输结构域的区域。在一些任何此类实施方案中,与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子被截短以缺乏细胞内信号传导结构域或运输结构域的全部或一部分。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的细胞表面分子含有所述参考细胞表面分子的一个或多个细胞外结构域。在一些实施方案中,与所述参考细胞表面分子相比,经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

[0042] 在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的细胞表面分子能够结合所述参考细胞表面分子的天然配体或底物。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的细胞表面分子与所述参考细胞表面分子的天然配体或底物的结合减少,或所述经修饰的细胞表面分子不结合所述参考细胞表面分子的天然配体或底物。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的细胞表面分子含有所述参考细胞表面分子的至少一个细胞外结构域,但缺乏由所述参考细胞表面分子的天然配体或底物识别的一个或多个其他细胞外结构域。在一些方面,所述至少一个细胞外结构域含有由特异性地结合所述参考细胞表面分子的抗体或其抗原结合片段识别的表位。在一些任何此类实施方案中,所述抗体或抗原结合片段选自AMG-102、AMG-479、BIIB0220A-5D5、CP-751,871、IMC-A12、R1507、3F8、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗、阿德木单抗(adecatumumab)、阿夫土珠(afutuzumab)、阿仑单抗、喷替酸阿妥莫单抗(altumomab pentetate)、麻安莫单抗(anatumomab mafenatox)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿西莫单抗、阿塞珠单抗(aselizumab)、阿特殊单抗(atlizumab)(=托西珠单抗(tocilizumab))、巴利昔单抗、贝妥莫单抗(bectumomab)、贝那利珠单抗(benralizumab)、贝索单抗(besilesomab)、莫比伐珠单抗(bivatuzumab mertansine)、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、莫坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)、卡罗单抗喷地肽(capromab pendetide)、卡妥索单抗(catumaxomab)、CC49、西利珠单抗(cedelizumab)、西莫白介素(celmoleukin)、西妥昔单抗、西妥木单抗(cixutumumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、泰坦-克利妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)、CNT0-95、可那木单抗(conatumumab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、达利珠单抗(daclizumab)、达雷木单抗(daratumumab)、地莫单抗(detumomab)、依美昔单抗(ecromeximab)、厄妥索单抗(ertumaxomab)、依决洛单抗(edrecolomab)、依法利珠单抗(efalizumab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、PEG化恩莫单抗(enlimomab pegol)、西依匹莫单抗(epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄利珠单抗(erlizumab)、埃达珠单抗(etaracizumab)、法索单抗(fanolesomab)、法拉莫单抗(faralimomab)、法勒珠单抗(farletuzumab)、芬妥木单抗(figitumumab)、加利昔单抗(galiximab)、加维莫单抗(gavilimomab)、吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)、维汀-格仑妥木单抗、戈利昔单抗(gomiliximab)、伊巴利珠单抗(ibalizumab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗(igovomab)、英妥木单抗(intetumumab)、伊妥木单抗(iratumumab)、伊诺莫单抗(inolimomab)、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、伊匹木单抗(ipilimumab)、凯利昔单抗(keliximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、林妥珠单抗(lintuzumab)、来沙木单抗(lexatumumab)、鲁卡木单抗(lucatumumab)、鲁昔单抗(lumiliximab)、马帕木单抗(mapatumumab)、马司莫单抗(maslimomab)、马妥珠单抗(matuzumab)、米拉妥珠单抗(milatuzumab)、明瑞莫单抗(minretumomab)、米妥莫单抗(mitumomab)、莫罗单抗

(muromonab)-CD3、他那莫单抗(naptumomab estafenatox)、那他株单抗(natalizumab)、耐昔妥珠单抗(necitumumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥度莫单抗(odulimomab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥拉单抗(olaratumab)、莫奥珠单抗(oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗(oregovomab)、奥昔珠单抗(otelixizumab)、帕尼单抗(panitumumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、喷妥莫单抗(pemtumomab)、普立昔单抗(priliximab)、PRO 140、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、罗妥木单抗(robatumumab)、利妥昔单抗(rituximab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、鲁利单抗(ruplizumab)、沙妥莫单抗喷地肽(satumomab pendetide)、西利珠单抗(siplizumab)、索土珠单抗(sontuzumab)、他多赛珠单抗(tadocizumab)、帕他普莫单抗(taplutumomab paptox)、替奈昔单抗(teneliximab)、特普利珠单抗(teplizumab)、TGN1412、替西木单抗(ticilimumab)(=曲美木单抗(tremelimumab))、替加珠单抗(tigatuzumab)、托西珠单抗(tocilizumab)(=atlizumab)、托利珠单抗(toralizumab)、托西莫单抗(tositumomab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、曲美木单抗(tremelimumab)、妥考妥珠单抗、维多株单抗(vedolizumab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、维西珠单抗(visilizumab)、vitaxin、伏洛昔单抗(volociximab)、伏妥莫单抗(votumumab)、扎鲁木单抗(zalutumumab)、扎木单抗(zanolimumab)、齐拉木单抗(ziralimumab)、阿佐莫单抗(zolimomab aritox)、阿特珠单抗(Atezolizumab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)(Avastin®)、地诺单抗(denosumab)、地努图希单抗(dinutuximab)、纳武单抗(nivolumab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、皮地利珠单抗(pidilizumab)(CT-011)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、司妥昔单抗(siltuximab)、曲妥珠单抗-美坦新偶联物(ado-trastuzumab emtansine)、CEA-scan Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C、MEDI4736、或其抗原结合片段。

[0043] 在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面受体是EGFR,并且所述经修饰的细胞表面受体是经修饰的EGFR。在一些方面,所述经修饰的EGFR含有由西妥昔单抗或其抗原结合片段特异性识别的表位。在一些情形中,所述经修饰的EGFR缺乏参考EGFR的EGFR结构域I、EGFR结构域II、EGFR近膜结构域和EGFR酪氨酸激酶结构域中的一个或多个。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的EGFR缺乏参考EGFR的EGFR结构域I、EGFR结构域II、EGFR近膜结构域和EGFR酪氨酸激酶结构域中的全部结构域。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的EGFR包含细胞外结构域,所述细胞外结构域由参考EGFR的亚结构域III和亚结构域IV组成或基本上由其组成。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的EGFR包含在SEQ ID NO:44或46中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:44或46至少或至少约85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。

[0044] 在一些任何此类实施方案中,所述参考细胞表面受体是HER2,并且所述经修饰的细胞表面受体是经修饰的HER2。在一些方面,所述经修饰的HER2含有由曲妥珠单抗或其抗原结合片段特异性识别的表位。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的HER2缺乏参考HER2的HER2结构域I、HER2结构域II、HER2结构域III中的一个或多个。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的HER2缺乏参考HER2的HER2结构域I、HER2结构域II和HER2结构域III中的全部结构域。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的HER2包含细胞外结构域,所述细胞外结构域由参考HER2的结构域IV组成或基本上由其组成。在一些任何此类实施方案中,所述经修饰的HER2含有在SEQ ID NO:92中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:92至

少或至少约85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。

[0045] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是参考PSMA,并且所经修饰的细胞表面分子是经修饰的PSMA。在一些实施方案中,所述参考PSMA是野生型PSMA,任选地野生型人PSMA。在一些实施方案中,所述参考PSMA是人PSMA和/或包含SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:96或97中所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述经修饰的PSMA包含参考PSMA的细胞外部分和跨膜结构域。

[0046] 在一些实施方案中,与参考PSMA相比,所述经修饰的PSMA在细胞内区域中包含一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸修饰包含一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。在一些实施方案中,与参考PSMA相比,所述经修饰的PSMA展现改变的细胞内化。

[0047] 在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列中的位置,所述经修饰的PSMA包含与W2G对应的氨基酸取代或者不包含W2或者不包含在位置2处的任何残基。在一些实施方案中,与参考PSMA相比,所述经修饰的PSMA包含11个N末端氨基酸的缺失或截短。

[0048] 在一些实施方案中,所述经修饰的PSMA包含能够由抗体或其抗原结合片段识别的表位。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段选自J591、DF0-J591、CYT-356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107-1A4、YPSMA-1、YPSMA-2、3E6、2G7、24.4E6、GCP-02、GCP-04、GCP-05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7-Fc、D7-CH3、4D4、A5、及其抗原结合片段。

[0049] 在一些任何此类实施方案中,所述细胞表面缀合物不是免疫原性的和/或在给予它的受试者中不诱导免疫应答。

[0050] 还提供了含有编码本文描述的任何实施方案的细胞表面缀合物的核酸序列的多核苷酸。在一些实施方案中,所述核酸序列进一步含有信号序列。在一些情形中,所述信号序列编码源自GMCSFR $\alpha$ 链的信号肽。

[0051] 在一些任何此类实施方案中,所述核酸序列是第一核酸序列,并且所述多核苷酸进一步含有编码重组受体的第二核酸序列。在一些情况下,所述重组受体是或含有嵌合抗原受体(CAR)。在一些任何此类实施方案中,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列被内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分开,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A或P2A。在一些实施方案中,所述第一核酸序列在所述第二核酸序列的上游。在一些实施方案中,所述第一核酸序列在所述第二核酸序列的下游。

[0052] 提供了含有本文描述的任何实施方案的多核苷酸的载体。在一些实施方案中,所述载体是病毒载体。在一些任何此类实施方案中,所述载体是逆转录病毒载体。在一些任何此类实施方案中,所述载体是慢病毒载体或 $\gamma$ 逆转录病毒载体。

[0053] 还提供了产生工程化细胞的方法,所述方法包括将上面描述的任何实施方案的多核苷酸或上面描述的任何实施方案的载体引入细胞中。还提供了通过本文描述的方法产生的工程化细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞含有本文描述的任何实施方案的多核苷酸或本文描述的任何实施方案的载体。

[0054] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化细胞含有上面描述的任何实施方案的细胞表面缀合物。在一些情形中,所述工程化细胞进一步含有重组受体。在一些方面,所述重

组受体结合与疾病或障碍相关的靶抗原。在一些情况下,所述疾病或障碍是感染性疾病或障碍、自身免疫性疾病、炎性疾病、或肿瘤或癌症。

[0055] 在一些任何此类实施方案中,所述靶抗原是肿瘤抗原。在一些实施方案中,所述靶抗原选自以下的靶抗原:  $\alpha$ v $\beta$ 6整合素( $\alpha$ v $\beta$ 6整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CC基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、III型表皮生长因子受体突变(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 $\alpha$ 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 $\alpha$ (IL-22Ra)、IL-13受体 $\alpha$ 2(IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 $\kappa$ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、天然杀伤组2成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Wilms肿瘤1(WT-1)。

[0056] 在一些任何此类实施方案中,所述靶抗原选自ROR1、HER2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha$ 2、kdr、 $\kappa$ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)和细胞周期蛋白A1(CCN1)。

[0057] 在一些任何此类实施方案中,所述重组受体是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。在一些任何此类实施方案中,所述重组受体是嵌合抗原受体(CAR)。在一些任何此类实施方案中,所述重组受体包含含有抗原结合结构域的细胞外部分。在一些例子中,所述抗原结合结构域是或含有抗体或抗体片段。

[0058] 在一些实施方案中,所述抗体片段是单链片段。在一些实施方案中,所述片段含有通过柔性免疫球蛋白接头连接的抗体可变区。在一些任何此类实施方案中,所述片段包含scFv。在一些任何此类实施方案中,所述重组受体包含激活型细胞内信号传导结构域。

[0059] 在工程化细胞的一些实施方案中,所述激活型细胞内信号传导结构域能够在T细胞中诱导初级激活信号,是T细胞受体(TCR)组分,和/或含有基于免疫受体酪氨酸的激活基



序 (ITAM)。在一些任何此类实施方案中,所述激活型细胞内信号传导结构域是或含有CD3-zeta (CD3 $\zeta$ ) 链的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

[0060] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化细胞进一步含有连接细胞外部分和激活型细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[0061] 在一些任何此类实施方案中,所述重组受体含有共刺激信号传导结构域。在一些情形中,所述共刺激信号传导结构域含有T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。在一些任何此类实施方案中,所述共刺激信号传导结构域含有CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。在一些任何此类实施方案中,所述共刺激信号传导结构域位于所述跨膜结构域与所述激活型细胞内信号传导结构域之间。

[0062] 在一些任何此类实施方案中,所述细胞是免疫细胞。在一些情况下,所述细胞是淋巴细胞。在一些任何此类实施方案中,所述细胞是T细胞或NK细胞。在一些例子中,所述细胞是T细胞,所述T细胞是CD8+T细胞或CD4+T细胞。

[0063] 还提供了含有上面描述的任何实施方案的工程化细胞的组合物。在一些情况下,所述组合物进一步含有药学上可接受的赋形剂。

[0064] 还提供了治疗方法,所述方法包括将上面描述的任何实施方案的工程化细胞或上面描述的任何实施方案的组合物给予至患有疾病或障碍的受试者。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或障碍、或感染性疾病。在一些任何此类实施方案中,所述方法进一步涉及向受试者给予结合分子,所述结合分子能够识别在工程化细胞上表达的细胞表面缀合物的药剂;并且检测表达细胞表面缀合物的细胞。在一些方面,检测包括体内成像。

[0065] 还提供了鉴定表达细胞表面缀合物的细胞的方法,所述方法包括使含有表达或可能表达本文描述的任何实施方案的细胞表面缀合物的细胞的组合物与能够识别细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触。在一些方面,所述方法在体外、离体或在体内进行。在一些实施方案中,经由体内成像来检测表达细胞表面分子的细胞。在一些任何此类实施方案中,所述体内成像方法选自磁共振成像 (MRI)、单光子发射计算机断层扫描 (SPECT)、计算机断层扫描 (CT)、计算机轴向断层扫描 (CAT)、电子束计算机断层扫描 (EBCT)、高分辨率计算机断层扫描 (HRCT)、内摆线断层扫描、正电子发射断层扫描 (PET)、闪烁扫描、 $\gamma$  照相机、 $\beta^+$  检测器、 $\gamma$  检测器、荧光成像、低光成像、X射线和生物发光成像。

[0066] 在一些任何此类实施方案中,所述结合分子与提供信号或诱导在体内可检测的信号的部分缀合。在一些例子中,所述部分是放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物或酶。

[0067] 还提供了鉴定用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括使得用编码细胞表面缀合物的本文描述的任何实施方案的多核苷酸或本文描述的任何实施方案的载体转导的组合物与能够识别细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触;并且鉴定与所述结合分子结合的细胞。还提供了鉴定用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括将编码细胞表面缀合物的本文描述的任何实施方案的多核苷酸或本文描述的任何实施方案的载体引入细胞中;使包含所述细胞的组合物与能够识别细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触;并且鉴定组合物的与所述结合分子结合的细胞。

[0068] 还提供了选择用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括使得用编码细

胞表面缀合物的本文描述的任何实施方案的多核苷酸或本文描述的任何实施方案的载体转导的组合物与能够识别细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触;并且分离与所述结合分子结合的细胞。进一步提供了选择用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括将编码细胞表面缀合物的本文描述的任何实施方案的多核苷酸或本文描述的任何实施方案的载体引入细胞中;使包含所述细胞的组合物与能够识别细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触;并且分离组合物的与所述结合分子结合的细胞。

[0069] 在一些任何此类实施方案中,所述结合分子与可检测部分缀合或能够产生可检测的信号。在一些情形中,所述可检测部分含有荧光蛋白。

[0070] 在一些任何此类实施方案中,所述药剂是链霉亲和素结合肽。在一些情况下,所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8) 或 Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。在一些方面,所述链霉亲和素结合肽是或含有序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0071] 在一些实施方案中,所述结合分子是能够可逆地结合所述药剂的试剂。在一些方面,所述试剂是链霉亲和素类似物或突变蛋白。在一些情形中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与位置44至47对应的序列位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白含有氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。

[0072] 在一些任何此类实施方案中,链霉亲和素类似物或突变蛋白含有a) 在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列;b) 如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或c) a) 或b) 的功能片段,所述功能片段可逆地结合所述药剂。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与117、120和/或121对应的位置处,链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步含有一个或多个氨基酸置换。

[0073] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>;或者所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一种或多种;或者所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。

[0074] 在一些任何此类实施方案中,链霉亲和素类似物或突变蛋白含有a) 在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;b) 如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列,并且可逆地结合所述药剂;或c) a) 或b) 的功能片段,所述功能片段可逆地结合所述药剂。

[0075] 在一些任何此类实施方案中,所述方法进一步包括破坏所述结合分子与所述药剂

的可逆结合。在一些方面,所述破坏包括使所述细胞与含有能够逆转所述结合分子与所述药剂之间的键的物质的组合物接触。在一些情况下,所述物质是自由结合配偶体和/或是竞争剂。在一些实施方案中,所述物质是或含有生物素、生物素类似物或其生物活性片段。

[0076] 在一些任何此类实施方案中,所述结合分子是特异性结合所述药剂的抗体或抗原结合片段。在一些例子中,所述结合分子是抗Strep标签抗体。

[0077] 本文还提供了含有与细胞毒性剂缀合的链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白的分子。在一些方面,所述分子含有链霉亲和素类似物或突变蛋白。在一些实施方案中,所述链霉亲和素或链霉亲和素类似物与链霉亲和素结合肽结合。

[0078] 在一些例子中,链霉亲和素结合肽含有序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。在一些任何此类实施方案中,所述链霉亲和素结合肽是或含有序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0079] 在一些任何此类实施方案中,所述链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白展现平衡解离常数(K<sub>D</sub>)为从或从约10<sup>-4</sup>M至10<sup>-10</sup>M的对链霉亲和素结合肽的结合亲和力。在一些任何此类实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与位置44至47对应的序列位置处,链霉亲和素类似物或突变蛋白含有氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。

[0080] 在一些任何此类实施方案中,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白含有a)在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列;b)如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或c) a)或b)的功能片段,所述功能片段结合所述链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与117、120和/或121对应的位置处,链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步含有一个或多个氨基酸置换。

[0081] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>;或者所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一种或多种;或者所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。

[0082] 在一些任何此类实施方案中,链霉亲和素类似物或突变蛋白含有a)在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;b)如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列,并且可逆地结合所述药剂;或c) a)或b)的功能片段,所述功能片段可逆地结合所述链霉亲和素结合肽。

[0083] 在一些任何此类实施方案中,所述细胞毒性剂是毒素。在一些例子中,所述毒素是肽毒素、蓖麻毒素A链毒素、相思豆毒素A链、白喉毒素(DT)A链、假单胞菌外毒素、志贺毒素A

链、白树毒素、苦瓜毒蛋白 (Momordin)、美洲商陆抗病毒蛋白、皂草素、天花粉蛋白或大麦毒素。在一些情形中,所述细胞毒素是光毒素。

[0084] 还提供了杀伤细胞的方法,所述方法包括将本文描述的任何实施方案的分子给予至先前给予过本文描述的任何实施方案的细胞或上面描述的任何实施方案的组合物的受试者。在一些方面,在所述受试者展现与所给予的细胞相关的毒性结果的时候或在所述受试者展现针对所给予的细胞的可检测的和/或细胞介导的免疫应答的时候给予所述分子。在一些情形中,所述毒性结果与神经毒性或细胞因子释放综合征 (CRS) 相关。

## 附图说明

[0085] 图1描绘了用于从相同构建体中在一个细胞中表达两种蛋白质的、被2A核糖体跳跃元件分开的、编码重组受体 (例如, CAR) 和所提供的示例性细胞表面缀合物 (例如, 与 Strep-标签 (ST) 连接的细胞表面分子 (CSM) (CSM-ST)) 的核酸分子的示意图。还显示了通过使经基因修饰的细胞与 (A) 结合固体表面的非抗体试剂 (例如 Strep-Tactin) 或 (B) 对细胞表面缀合物的药剂具特异性的抗 Strep-标签抗体接触来靶向所表达的细胞表面缀合物的药剂,以便独立于所表达的重组受体选择经基因修饰的细胞的示例性方法。

[0086] 图2描绘了用于从相同构建体中在一个细胞中表达两种蛋白质的、被T2A核糖体开关分开的、编码重组受体 (例如, Tg受体) 和所提供的示例性细胞表面缀合物 (例如, 与 Strep-标签 (ST) 连接的截短的表皮生长因子受体 (tEGFR) (tEGFR-ST)) 的核酸分子的示意图。还显示了通过使经基因修饰的细胞与 (A) 结合固体表面的非抗体试剂 (例如 Strep-Tactin) 或 (B) 对细胞表面缀合物的药剂具特异性的抗 Strep-标签抗体接触来靶向所表达的细胞表面缀合物的药剂,以便独立于所表达的重组受体选择经基因修饰的细胞的示例性方法。

## 具体实施方式

[0087] I. 用于加工基因修饰的细胞的细胞表面缀合物

[0088] 本文提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有细胞表面分子 (如细胞表面蛋白) 和至少一种药剂 (如亲和标签,例如肽剂)。在一些实施方案中,将所提供的细胞表面缀合物工程化或在细胞中表达以允许如经由对所述缀合物的药剂具特异性的结合分子对细胞的特异性靶向、对细胞的分离或选择、或对细胞的检测中的一种或多种,所述结合分子不结合或识别所述缀合物的细胞表面分子。在一些实施方案中,所述细胞表面分子不是重组受体,如不是抗原受体,例如,不是嵌合抗原受体 (CAR)。在一些实施方案中,所提供的细胞表面缀合物被共工程化到表达重组受体 (例如 CAR) 的细胞中,由此可以利用所述细胞表面缀合物来处理表达重组受体的细胞,如结合用于检测、选择、分离或基于自杀地删减工程化细胞的方法。

[0089] 多种策略可用于产生和给予工程化细胞用于过继疗法。通常,通过引入一种或多种基因工程化核酸或其产物来将细胞工程化。此类产物包括基因工程化抗原受体,包括工程化T细胞受体 (TCR) 和功能性非TCR抗原受体 (如嵌合抗原受体 (CAR),包括激活的、刺激的和共刺激的CAR)、及其组合。例如,策略可用于将表达嵌合受体 (如CAR) 的细胞 (如T细胞) 工程化,以及向受试者给予含有此类工程化细胞的组合物。在产生工程化细胞的整个过程中,

能够鉴定、检测、定位和/或选择所转导的细胞是有益的。在给予工程化细胞用于过继疗法之后,还需要监测所转导的细胞并提供耗尽或减少受试者中转导细胞数量的机制。

[0090] 用于选择和分离细胞的已知方法包括使用CAR特异性抗体来结合目标细胞。例如,使用生物素化的山羊抗小鼠IgG (Fab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch) 用于检测经CAR修饰的T细胞在本领域中是已知的 (Brentjens等人, *Sci. Transl. Med.* 2013年3月; 5 (177) : 177ra38)。由于这种多克隆抗体的灵敏度低,在患者样品中淋巴细胞数目低的情况下,仅在使用Dynabeads对T细胞进行非特异性扩增之后才能完成对经CAR修饰的T细胞的检测。这阻止了在输注之后直接评估在体内循环的经CAR-修饰的T细胞。还已经描述了使用蛋白质L用于通过流式细胞术检测经CAR修饰的T细胞 (Zheng等人, *J. Transl. Med.* 2012年2月; 10:29)。这种试剂在多参数流式细胞术测定中的检测和灵敏度方面具有有限的用途。尚未显示该试剂在其他测定形式中的用途。另一种方法利用直接引入CAR中特定定位点的Strep-标签II序列,由此使用针对Strep-标签的结合试剂直接评估CAR (Liu等人 (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; 国际专利申请公开号W0 2015095895)。此外,特异性结合CAR多肽的单克隆抗体也是已知的 (参见国际专利申请公开号W02014190273)。尽管在一些情境中有用,但是直接或间接结合CAR的试剂可能有激活CAR以诱导细胞信号传导和工程化细胞的激活的风险,关于在离体产生和制造过程中分离或选择细胞这并不总是期望的。

[0091] 在一些方面,外在标记基因结合工程化细胞疗法用于允许检测或选择细胞,并且在一些情况下还用于促进通过ADCC进行细胞自杀。这样的标记基因的示例是截短的表皮生长因子受体 (EGFRt), 其可以与转导细胞中的目标转基因 (CAR或TCR) 共表达 (参见,例如美国专利号8,802,374)。EGFRt含有由抗体西妥昔单抗 (**Erbitux®**) 识别的表位。出于这个原因, **Erbitux®** 可以用于鉴定或选择已经用EGFRt构建体工程化的细胞,包括还用另一种重组受体 (如嵌合抗原受体 (CAR)) 共同工程化的细胞。另外地,EGFRt通常用作结合细胞疗法的自杀机制。在一些方面,当EGFRt在具有目标转基因 (例如CAR或TCR) 的细胞中共表达时,它可以被西妥昔单抗单克隆抗体靶向,以经由ADCC减少或耗尽转化的经基因修饰的细胞 (参见,美国专利号8,802,374和Liu等人, *Nature Biotech.* 2016年4月; 34 (4) : 430-434)。重要地,使用tEGFR的自杀杀伤方法要求抗体表位的可用性。

[0092] 本领域已知的上述方法可能具有干扰细胞的加工、产生和/或功能的潜在问题。需要有助于涉及转导细胞产品的产生、监测和给予后阶段的细胞表面标记。例如,用于有效选择和分离对转基因呈阳性的细胞和用于在体内和离体监测转基因表达细胞的方法是期望的。所提供的细胞表面缀合物和方法解决了此类需求和/或解决了与现有方法和试剂相关的一个或多个问题。在一些实施方案中,与结合工程化细胞使用的现有标记或选择策略相比,所提供的缀合物提供了一个或多个优点。

[0093] 在一些实施方案中,所提供的缀合物是含有细胞表面分子的缀合物,所述细胞表面分子缺乏细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导,所述细胞表面分子连接或缀合了药剂如亲和标签 (例如肽)。在一些实施方案中,所述药剂是由结合分子识别的一种药剂。在一些实施方案中,所提供的细胞表面缀合物的药剂是链霉亲和素结合肽 (例如Strep-标签®), 熟知的结合分子可用于所述链霉亲和素结合肽。在一些方面,细胞表面缀合物是包含细胞表面分子或其修饰形式和药剂 (例如亲和标签) 的融合蛋白。

[0094] 在一些实施方案中,所述细胞表面分子是经修饰的细胞表面分子,其与参考细胞表面分子相比发生了改变。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是天然哺乳动物细胞表面分子。在一些情况下,所述细胞表面分子被修饰,例如,与参考细胞表面分子相比,被截短或含有一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。在一些实施方案中,所述细胞表面分子含有截短,例如,除去细胞内信号传导结构域和/或其他细胞内结构域或一个或多个细胞外结构域的全部或一部分的截短。在一些实施方案中,所述细胞表面分子含有或保留至少一个由抗体或抗原结合片段识别的表位,在一些情况下,所述表位另外允许独立于所述药剂靶向所述缀合物的细胞表面分子,例如,以介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 用于作为安全开关机制选择性删减或自杀工程化细胞。在一些实施方案中,所述缀合物的细胞表面分子含有经修饰的表皮生长因子受体 (EGFR),如截短的EGFR (参见,例如美国专利号8,802,374)。在一些实施方案中,所述缀合物的细胞表面分子含有经修饰的前列腺特异性膜抗原 (PSMA),如经修饰的PSMA,例如截短的PSMA (tPSMA)。

[0095] 在一些实施方案中,所述药剂是由结合分子识别的一种药剂,其中与其结合是可逆的和/或其中与结合分子的结合能够在竞争物质的存在下被竞争或破坏。在一些实施方案中,所述结合分子是或包含如下试剂,所述试剂对所述竞争物质展现的结合亲和力比对所述药剂展现的结合亲和力更高。在一些实施方案中,所述结合分子是如下试剂,所述试剂是或包含链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白,并且所述药剂是链霉亲和素结合肽,例如Strep-标签®。

[0096] 在一些实施方案中,某些链霉亲和素突变蛋白分子 (例如Strep-Tactin) 能够在生物素或生物素类似物或模拟物的存在下可逆地结合某些链霉亲和素结合肽 (例如Strep-标签®),所述生物素或生物素类似物或模拟物对链霉亲和素突变蛋白展现的结合亲和力高于链霉亲和素突变蛋白对链霉亲和素结合肽展现的结合亲和力。因此,在某些方面,所述细胞表面缀合物的药剂 (例如链霉亲和素结合肽,如Strep-标签®) 与所述结合分子 (例如链霉亲和素突变蛋白,如Strep-Tactin) 之间的结合可以通过添加竞争物质 (例如生物素或生物素模拟物) 破坏。在一些实施方案中,此类结合试剂,例如链霉亲和素突变蛋白结合试剂,不会通过ADCC诱导基于自杀的杀伤。此外,链霉亲和素突变蛋白可以被格式化为可溶性试剂或结合在固相中 (如在固定相中,如存在于柱 (例如柱色谱或平面色谱) 中),以促进细胞选择或分离。

[0097] 在一些实施方案中,所述细胞表面缀合物含有 (1) 经修饰的细胞表面分子,如缺乏细胞内信号传导结构域和/或用于结合同源配体的一个或多个细胞外结构域的经修饰的细胞表面受体,以及 (2) 至少一种链霉亲和素结合肽药剂 (Strep-标签®)。描述了示例性细胞表面分子,并且其包括例如经修饰的表皮生长因子受体。在一些实施方案中,所述细胞表面缀合物可以经由结合分子试剂检测,所述结合分子试剂是或包含链霉亲和素突变蛋白。在替代性例子中,可以通过高亲和力单克隆抗Strep标签抗体实现链霉亲和素或结合肽 (例如Strep-标签®) 的特异性检测。

[0098] 在一些实施方案中,所述药剂与细胞表面分子 (如经修饰的细胞表面分子) 的细胞外 (N末端或C末端) 部分融合。在一些实施方案中,仅在细胞表面分子的暴露的N末端或C末端连接所述药剂使所述药剂暴露,使得其易于检测和/或其检测在空间上不被阻断。在一些

实施方案中,细胞表面分子含有能够由结合分子(如抗体或抗原结合片段或配体)识别或结合的表位,例如以诱导或实施结合安全开关方法的自杀删减。因此,在所述细胞表面分子的N末端序列或C末端序列处连接所述药剂可以保留细胞表面分子表位的接近,供特异性抗体或抗原结合片段的识别。在一些实施方案中,所述细胞表面缀合物保留例如经由西妥昔单抗与工程化细胞上的EGFRt的结合介导的所述细胞表面分子的安全开关功能。

[0099] 在一些实施方案中,所提供的细胞表面缀合物包括其中细胞的选择或鉴定可以与细胞的激活或自杀分开的那些。在一些情况下,使用针对特定抗原受体(例如CAR)的抗体的选择过程可能导致所述受体(例如CAR)的意外激活以及通过所述受体(例如CAR)的无意信号传导。通过所提供的细胞表面缀合物避免了这个问题,所述细胞表面缀合物独立于抗原受体在细胞表面上表达。在一些实施方案中,所提供的细胞表面缀合物允许重组受体(例如CAR)的功能保持分离并且不受涉及细胞表面缀合物的活性的影响。在一些情况下,所述缀合物的检测作为转导的确认将不会导致CAR的意外激活和通过CAR的无意信号传导。因此,在一些实施方案中,可以降低偏离靶标效应(off target effect)的可能性。

[0100] 同样,由于所述缀合物的细胞表面分子不是抗原受体,例如CAR,并且独立于抗原受体在工程化细胞上共表达,所以对工程化细胞的识别可以基于细胞表面缀合物的表达而不基于信号传导分子。在一些方面,所提供的细胞表面缀合物具有以下优点:经由所提供的缀合物的药剂检测或选择工程化细胞不依赖于抗原受体(例如CAR)的表达,和/或表达了多少抗原受体(例如CAR)。

[0101] 所提供的细胞表面缀合物还为工程化细胞提供了不需要针对每种细胞疗法重新配置或开发的一般或通用标记。因此,与某些现有技术方法不同,所提供的缀合物和方法避免了为每种转基因开发单独的标记试剂的需要和/或避免了开发特异性靶向受体(例如CAR或TCR)的某些结构域的单独的选择试剂。因此,所提供的方法比现有技术方法耗时更少并且节省了试剂资源。

[0102] 在可用的现有技术方法中,在一些情况下,选择过程可能导致细胞的损失或损伤。在一些方面,使用相同的结合分子(例如在EGFRt的情况下为西妥昔单抗)选择细胞和选择性靶向细胞进行自杀的方法并不理想。在一些情况下,使用特异性抗体(例如西妥昔单抗)经由蛋白质标记(例如EGFRt)选择或分离转导细胞的方法可能导致由于基于ADCC自杀的机制引起的细胞损失。然而,在工程化细胞的离体生产和进一步加工期间,不希望细胞的自杀和损失。由于所提供的细胞表面缀合物可以由非抗体试剂(例如链霉亲和素突变蛋白试剂)识别,因此可以避免与结合细胞制造的选择过程中的细胞损失相关的问题。此外,与直接或间接地结合重组受体(例如CAR)的试剂(所述试剂可能有刺激CAR以诱导细胞信号传导和工程化细胞的刺激的风险)不同,所提供的实施方案允许在不通过CAR刺激信号的情况下将细胞工程化、选择、分离、产生、加工或制造。

[0103] 此外,在一些情况下,采用抗体分子进行细胞选择的现有技术方法以抗体与特定靶标的结合是不可逆的或无法有效或快速可逆的方式进行。在一些情况下,识别细胞表面标记或直接识别抗原受体(例如CAR)的高亲和力抗体(以及特别是 $K_D$ 为 $10^{-9}$ M或更低的抗体)导致抗体从细胞中的分离较慢。在一些情况下,当此类抗体用于结合细胞的产生和制造来选择抗原受体(例如CAR)工程化细胞时,如果抗体保持附着于细胞,则存在残留抗体可能保留在最终的配制品或制品中的风险。向受试者给予此类产品可能导致受试者的不良效果。



因此,在一些方面,本文提供的细胞表面缀合物含有药剂(例如链霉亲和素结合肽,如Strep标签),所述药剂对某些结合分子试剂(例如链霉亲和素突变蛋白,如Strep-Tactin)展现较低的亲和力相互作用,以便避免这个问题并降低结合分子试剂保留在药物产品中的风险。另外,关于制造细胞疗法,完全解离或破坏药剂与其结合分子的结合的方法是期望的。

[0104] 在一些实施方案中,所提供的细胞表面缀合物通过保留或保存由特定抗体识别的表位而保留所述缀合物的细胞表面分子(例如EGFRt或PSMA)的安全开关功能。例如,所提供的细胞表面缀合物可以被对所述缀合物的细胞表面分子特异的结合分子(例如抗体或其抗原结合片段)和对所述缀合物的药剂特异的结合分子特异性结合,如非竞争性结合。在一些方面,通过ADCC靶向细胞表面分子,这取决于细胞表面分子的抗体表位的可用性,在各种应用中提供增加的细胞表面缀合物的功能。

[0105] 作为ADCC介导的活性的替代物,可以通过靶向细胞表面缀合物的药剂来促进受试者中转导细胞产物的耗尽或减少。在一些实施方案中,可以将所提供的药剂进一步修饰以展现安全开关特性,如通过将对所述药剂特异的结合分子与毒素或其他细胞毒性剂(下文也称为“自杀剂”)连接或缀合。在一些方面,所提供的自杀剂不依赖于细胞自杀的ADCC机制,所述ADCC机制在一些情况下由于抗体的药代动力学可能是缓慢的。在一些实施方案中,所述结合分子不是抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述自杀剂的结合分子是链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白,如所描述的任何一种,其在一些情况下与作为链霉亲和素结合剂的药剂结合。在一些实施方案中,可以使用通过将试剂(Strep-Tactin®)缀合的毒素递送至药剂(Strep-标签®)的自杀。在一些方面,与使用抗体激活ADCC相比,由毒素缀合的试剂介导的杀伤允许更快的递送。与基于抗体的自杀机制相比,此类自杀剂(例如链霉亲和素突变蛋白-毒素)可以对工程化细胞展现更迅速或更快的特异性细胞杀伤作用。在一些实施方案中,相比基于抗体的机制启动的细胞杀伤,所述细胞杀伤的启动更快约超过或超过或约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。

[0106] 还提供了由细胞表达的细胞表面缀合物的方法和用途,如结合加工、制造或给予后监测,结合过继疗法。在一些实施方案中,提供了用于在体内或离体检测表达细胞表面缀合物的转导细胞的方法。在一些实施方案中,提供了选择(如分离或回收)已成功转导以表达细胞表面缀合物的细胞的方法。在一些实施方案中,还提供了用于将表达细胞表面缀合物的细胞自杀杀伤的方法。

[0107] 在一些实施方案中,所提供的方法涉及将细胞与细胞表面缀合物和所需的重组受体转基因(例如CAR或TCR)共同工程化。还提供了用于用细胞表面缀合物和重组受体来共同工程化细胞的载体。在一些实施方案中,提供了含有细胞表面缀合物的编码序列的骨架载体构建体。在一些情况下,通过在将细胞基因工程化以独立表达细胞表面缀合物和重组受体的方法中使用这样的骨架构建体来实现提高效率。在一些实施方案中,含有细胞表面缀合物的骨架表达载体可以用于插入特异性靶向抗原的独特重组受体(CAR、TCR等)的转基因序列。在一些实施方案中,所得的载体构建体包括编码重组受体的核酸序列、编码2A元件(例如T2A核糖体跳跃元件)的序列、和编码细胞表面缀合物的序列(例如在编码CAR的序列的下游)。因此,在一些方面,编码重组受体(例如CAR)和缀合物的构建体被2A元件(例如,T2A核糖体开关)分开,用于从相同构建体中表达两种蛋白质。在一些实施方案中,可以修饰此类提供的构建体以容易地编码任何重组受体(例如CAR)。



[0108] 还提供了用于使用表达细胞表面缀合物的细胞的方法。提供了细胞分离和基因工程的方法。提供了编码细胞表面缀合物的核酸(如构建体,例如病毒载体)和/或细胞表面缀合物的编码核酸和/或蛋白质,以及用于如通过转导将此类核酸引入细胞中的方法。还提供了含有工程化细胞的组合物,以及用于向受试者给予和监测细胞和组合物(如用于过继细胞疗法)的方法、试剂盒和设备。

## [0109] II. 细胞表面缀合物

[0110] 本文提供了细胞表面缀合物,所述细胞表面缀合物含有细胞表面分子和至少一种药剂(例如肽),如亲和标签,所述药剂能够由结合分子特异性识别。在一些实施方案中,所提供的缀合物是或包括融合蛋白。在一些实施方案中,所述缀合物的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。在一些方面,所述细胞表面分子是与参考细胞表面分子相比发生了改变的经修饰的细胞表面分子,例如,是缺乏所述参考细胞表面分子的细胞内信号传导结构域的全部或部分的截短的细胞表面受体,和/或含有一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。在一些实施方案中,所述缀合物的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。在一些实施方案中,所述药剂(例如肽),如亲和标签,与所述细胞表面分子的N末端或C末端部分连接。在一些实施方案中,所述药剂是链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签®),并且所述细胞表面分子是经修饰的EGFR,如截短的EGFR。在一些实施方案中,所述药剂是链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签®),并且所述细胞表面分子是经修饰的PSMA,如截短的PSMA。

[0111] 在一些实施方案中,所提供的缀合物含有以下组分:细胞表面分子(CSM)、接头(L)和药剂(A),其由下式表示: $CSM-(L)_q-(A)_m$ ,其中q是0或更大并且m是至少1或是1。在一些实施方案中,选择变量q和m,使得所得的细胞表面缀合物在细胞上表达,并且可以经由所述药剂被结合分子检测,并且任选地,被对所述细胞表面分子的表位特异的抗体或抗原结合片段识别。在一些实施方案中,m是1至5,如1至4或1至3,例如,至少或至少约或约或1、2、3、4或5。在一些实施方案中,q是0至5,并且可以取决于所连接的药剂的数目。在一些实施方案中,可以按顺序连接几个接头。

[0112] 在一些方面,所述至少一种药剂直接与所述细胞表面分子连接。在一些方面,所述至少一种药剂经由至少一个接头间接地与所述细胞表面分子连接(linked或joined)。在一些实施方案中,所述药剂(例如肽),如亲和标签,经由其N末端或其C末端与所述细胞表面分子连接。在一些实施方案中,所述药剂被连接在所述细胞表面分子的膜远端细胞外部分。在一些实施方案中,所述药剂被连接在所述细胞表面分子的N末端。在一些实施方案中,所述药剂被连接在所述细胞表面分子的C末端。在一些实施方案中,所述药剂是长度为小于50个氨基酸的肽标签,所述肽标签直接或间接经由接头与所述细胞表面分子的细胞外(N末端)或(C末端)部分融合。在一些实施方案中,所述药剂与所述细胞表面分子的细胞外部分或结构域连接。在一些实施方案中,q是0并且m是1,并且所述药剂直接与所述细胞表面分子的N末端连接。在一些实施方案中,所提供的缀合物是或包括融合蛋白,如含有包括一种或多种细胞表面分子、接头或药剂的组分的融合蛋白。

[0113] 在一些方面,所述接头可以是肽、多肽或化学接头,其可以是可切割的或不可切割的。在一些方面,所述接头是肽,如含有短的氨基酸序列以连接多肽序列(或编码这样的氨基酸序列的核酸)的肽。在一些实施方案中,所述接头是缓解或减少可能由所述药剂接近所

述细胞表面分子引起的空间位阻和/或增加或改变所述缀合物的一种或多种特性(如表达、特异性或免疫原性)的一种接头。在一些实施方案中,可以通过重组方法促进连接或缀合。在一些实施方案中,所述接头是肽或多肽,并且所提供的缀合物是融合蛋白。

[0114] 融合蛋白可以包括细胞表面分子,所述细胞表面分子是细胞表面蛋白,如所描述的任何一种,其直接或间接地与肽或多肽剂(例如亲和标签,如链霉亲和素结合肽)连接。编码融合蛋白的核酸序列可以含有所述细胞表面蛋白和所述至少一种肽或多肽剂的编码序列,使得所述核酸序列含有两种或更多种蛋白质(在一些情况下2种、3种、4种、5种或更多种蛋白质)的编码序列。在一些实施方案中,每个编码序列在相同的阅读框中,使得当融合蛋白在宿主细胞中转录和翻译时,产生含有所述细胞表面蛋白和所述至少一种肽或多肽剂(例如链霉亲和素结合肽)的蛋白质。在一些方面,所述两种或更多种蛋白质中的每一种可以与构建体中的另一种蛋白质相邻,或者被含有1个、2个、3个或更多个但通常少于20个、15个、10个、9个、8个、7个或6个氨基酸的接头多肽(如肽接头)分开。

[0115] 示例性肽接头包括(Gly-Ser)<sub>n</sub>氨基酸序列,其在一些情况下可以包括分散在其中以增加溶解度的一些Glu或Lys残基。可以将接头长度定制为更长或更短,以确保结合分子接近所述药剂并确保抗体或抗原结合片段(或其他结合分子)接近所述缀合物的细胞表面分子。在一些实施方案中,所述接头是如GGGSGGGG(S SEQ ID NO:59);GGGGS(S SEQ ID NO:60);GGGS(S SEQ ID NO:61);GGGSGGGSGGGGS(S SEQ ID NO:62);GSTSGSGKPGSGEGSTKG(S SEQ ID NO:55);GGGSGGGGS(S SEQ ID NO:56)所示的任何一个。在一些实施方案中,所述接头是可切割接头。在一些实施方案中,可切割接头包含Phe-Leu接头、Gly-Phe-Leu-Gly接头(S SEQ ID NO:99)、Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala接头(如SEQ ID NO:98中所示)、Val-Cit接头或Phe-Lys接头(参见,例如美国专利6,214,345)。

[0116] 在一些实施方案中,所述细胞表面缀合物是非免疫原性的。在一些实施方案中,所述细胞表面缀合物不包含免疫原性的表位和/或不被免疫应答识别或不能在动物中诱导、引发或启动可检测的免疫应答,例如体液或细胞介导的免疫。细胞介导的免疫应答包括例如T细胞应答,如T细胞增殖、淋巴因子分泌、细胞毒性应答、局部炎症反应和/或募集另外的免疫细胞。体液应答包括例如激活B细胞,导致产生针对免疫原性表位的抗体。表达细胞表面缀合物的细胞诱导或引发免疫应答(如体液或细胞介导的免疫应答)的能力可以在向受试者给予此类细胞后进行评估。在一些实施方案中,可以对来自受试者的血清通过诸如ELISpot、细胞内细胞因子染色、ELISA(例如对于细胞因子)或基于细胞的抗体检测方法(例如,通过流式细胞术)等方法来鉴定特异性结合和/或中和细胞表面缀合物的结合表位的抗体的存在。在一些实施方案中,可以使用表达细胞表面缀合物的细胞(例如,经辐射的细胞)作为刺激细胞,使用细胞毒性T-淋巴细胞(CTL)测定检测特异性结合并诱导细胞毒性和/或混合的淋巴细胞反应的CD8<sup>+</sup>T细胞来评估细胞介导的对细胞表面缀合物的免疫应答。

[0117] 在一些实施方案中,编码细胞表面缀合物的多核苷酸还含有编码信号肽的信号序列,例如以用于将所表达的蛋白质靶向分泌途径以将所述缀合物插入细胞膜中。在一些方面,所述信号肽的长度为约5个-30个氨基酸并且存在于所编码的缀合物的N末端。在一些实施方案中,多核苷酸编码按N末端至C末端的顺序含有以下的缀合物:信号肽、药剂(例如亲和标签,如链霉亲和素结合肽)和细胞表面分子(例如经修饰的细胞表面分子,如EGFRt)。在一些实施方案中,所述信号肽是参考细胞表面分子的天然信号肽(例如包含在SEQ ID NO:

64-69中任一个中所示的序列中的天然信号肽)。在一些实施方案中,所述信号肽是异源的或非天然的信号肽,如SEQ ID NO:48中所示的GMCSFR $\alpha$ 链信号肽,在一些情况下,其由SEQ ID NO:47中所示的核苷酸编码。在一些实施方案中,多核苷酸编码按N末端至C末端的顺序含有以下的缀合物:细胞表面分子(例如PSMA)或经修饰的细胞表面分子(例如tPSMA)和药剂(例如亲和标签,如链霉亲和素结合肽)。

[0118] A.细胞表面分子,例如经修饰的细胞表面分子

[0119] 在一些实施方案中,所述缀合物的细胞表面分子含有至少一个细胞外结构域和跨膜结构域。在一些实施方案中,所述细胞表面分子能够在细胞表面上表达。在一些实施方案中,所述细胞表面分子是细胞表面受体、配体、糖蛋白、细胞粘附分子、抗原、整合素或分化簇(CD)或是其修饰形式。在一些实施方案中,所述细胞表面分子不是嵌合抗原受体。在一些实施方案中,所述细胞表面分子是经修饰的细胞表面分子,其与参考细胞表面分子相比发生了改变。在一些情况下,经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。

[0120] 在一些实施方案中,所述细胞表面缀合物的所述细胞表面分子含有与参考细胞表面分子相比发生改变的经修饰的细胞表面分子。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是细胞表面受体、配体、糖蛋白、细胞粘附分子、抗原、整合素或分化簇(CD)。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是细胞表面受体。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是天然哺乳动物细胞表面分子,如天然哺乳动物细胞表面受体。在一些情况下,所述细胞表面分子是天然的人膜蛋白。

[0121] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子可以是包含含有由抗体或其抗原结合片段识别的一个或多个表位的细胞外结构域或区域的一种细胞表面分子。所述抗体或抗原结合片段可以包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,所述功能性(抗原结合)抗体片段包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V<sub>H</sub>)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))以及单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。抗体或其抗原结合片段可以包括完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类,IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体,或全长抗体的部分或片段。在一些方面,所述抗体是经临床批准的抗体或其抗原结合片段。在一些方面,所述一个或多个表位可以含有分子或蛋白质的连续或非连续序列。在一些方面,所述一个或多个表位存在于所述参考细胞表面分子的细胞外部分或区域中,使得所述参考细胞表面分子可以被抗体或抗原结合片段识别、鉴定或检测。

[0122] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子的细胞外结构域在一些情况下还含有能够与结合配偶体、抗原、底物或配体特异性结合的结合结构域。在此类实施方案中,所提供的细胞表面分子包括经修饰的细胞表面分子,其中这样的结合结构域被修饰或改变,例如被突变或缺失,使得与所述参考细胞表面分子与结合配偶体、抗原、底物或配体的结合相比,经修饰的细胞表面分子与其正常同源结合配偶体、抗原、底物或配体结合的能力被降低。在一些情况下,所述改变的结合被减少了大于或大于约40%、大于或大于约50%、大于或大于约60%、大于或大于约70%、大于或大于约80%、大于或大于约90%或更多。

[0123] 在一些实施方案中,所述细胞表面分子是膜蛋白或膜整合蛋白。在一些实施方案中,所述细胞表面分子含有跨膜结构域。在一些方面,所述细胞表面分子是I型、II型、III型

或IV型膜蛋白。在一些方面,I型蛋白具有疏水性残基的单个跨膜延伸,其中跨膜结构域的氨基(N)-末端侧上的多肽部分暴露于膜的外侧并且羧基(C)-末端部分暴露于细胞质侧。在一些方面,I型膜蛋白被细分为Ia型(具有可切割的信号序列)和Ib(没有可切割的信号序列)。在一些方面,II型膜蛋白仅跨越膜一次,但它们的氨基末端位于细胞的细胞质侧并且羧基末端位于外部。在一些方面,III型膜蛋白在单个多肽链中具有多个跨膜结构域,并且可以细分为IIIIa型蛋白质(具有可切割的信号序列)和IIIIb型(氨基末端暴露在膜的外表面上,但是没有可切割的信号序列)。在一些方面,IV型蛋白具有多个同源结构域,其构成多次跨越膜的组件,其中结构域存在于单个多肽链或一个或多个不同的多肽链上。

[0124] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子进一步含有细胞内(或细胞质)区域或结构域,即存在于细胞内部和/或存在于细胞的细胞质侧的一个或多个连续氨基酸的区域。在一些情况下,参考细胞表面分子的细胞内区域含有细胞内信号传导结构域和/或能够介导细胞内信号传导(通过直接或间接调节细胞信号转导途径和/或下游反应、功能或活性(例如,基因和蛋白质表达、分子亚细胞定位的变化、细胞内运输、蛋白质-蛋白质相互作用的变化、受体内化、细胞分化、增殖和/或存活))。

[0125] 在一些实施方案中,细胞内信号传导区域或结构域(例如存在于或含有参考细胞表面分子的细胞质尾部)含有一个或多个基序或残基,所述一个或多个基序或残基能够在发出分子或细胞信号时(例如,当被激活或暴露于其同源抗原或配体时)在细胞中被磷酸化和/或与信号转导途径或下游过程中的一种或多种衔接子蛋白相互作用。在一些实施方案中,所述基序是或含有基于酪氨酸的基序(例如YXXO,其中Y是酪氨酸、X是任何氨基酸并且O是具有庞大疏水性基团的氨基酸)、或基于二亮氨酸的基序(例如LL)。在一些方面,参考细胞表面分子的细胞内信号传导结构域可以存在于I型膜蛋白的C末端处或附近,或存在于II型膜蛋白的N末端处或附近。在此类实施方案中,所提供的细胞表面分子包括经修饰的细胞表面分子,其中这样一种细胞内区域或结构域的氨基酸残基被修饰或改变(例如被突变,例如通过一个或多个取代、缺失、截短和/或插入),使得经修饰的细胞表面分子调节细胞信号转导途径和/或下游反应、功能或活性的能力被降低或阻止。在一些情况下,与参考细胞表面分子的这种信号传导和/或下游反应、功能或活性相比,所述改变的信号传导和/或下游反应、功能或活性被减少了大于或大于约40%、大于或大于约50%、大于或大于约60%、大于或大于约70%、大于或大于约80%、大于或大于约90%或更多。

[0126] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子不同于由重组受体(例如嵌合抗原受体(CAR))靶向的抗原(例如细胞表面表达的抗原)和/或与其不相同。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子或其修饰形式不被重组受体(例如嵌合抗原受体(CAR))的配体-或抗原-结合结构域特异性结合和/或识别。

[0127] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是或包括细胞表面蛋白和/或受体。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是EpCAM、VEGFR、整合素(例如,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_4\beta_7$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v$ )、TNF受体超家族(例如,TRAIL-R1、TRAIL-R2)、PDGF受体、干扰素受体、叶酸受体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受体、5T4、GD2、GD3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、或分化簇(例如,CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/基础免疫球蛋白、CD152/CTLA-4、

CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7)。

[0128] 合适的参考细胞表面分子(例如用于修饰的细胞表面分子)包括在美国专利号8,802,374中描述的那些,将所述专利通过引用特此并入。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是表皮生长因子受体(EGFR)、erbB-2受体酪氨酸蛋白激酶、erbB-3受体酪氨酸蛋白激酶、erbB-4受体酪氨酸蛋白激酶、肝细胞生长因子受体(HGFR/c-MET)或胰岛素样生长因子受体-1(IGFR-1)。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子含有在SEQ ID NO:49-54中任一个中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:49-54中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0129] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子可以是包含由抗体识别的表位的一种分子,所述抗体包括但不限于3F8、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗、阿德木单抗(adecatumumab)、阿夫土珠(afutuzumab)、阿仑单抗、喷替酸阿妥莫单抗(altumomab pentetate)、麻安莫单抗(anatumomab mafenatox)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿西莫单抗、阿塞珠单抗(aselizumab)、阿特珠单抗(atlizumab)(=托西珠单抗(tocilizumab))、巴利昔单抗、贝妥莫单抗(bectumomab)、贝那利珠单抗(benralizumab)、贝索单抗(besilesomab)、莫比伐珠单抗(bivatuzumab mertansine)、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、莫坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)、卡罗单抗喷地肽(capromab pendetide)、卡妥索单抗(catumaxomab)、CC49、西利珠单抗(cedelizumab)、西莫白介素(celmoleukin)、泊西他珠单抗(citatumumab bogatox)、克立昔单抗(clenoliximab)、泰坦-克利妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)、CNT0-95、可那木单抗(conatumumab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、达利珠单抗(daclizumab)、达雷木单抗(daratumumab)、地莫单抗(detumomab)、依美昔单抗(ecromeximab)、依决洛单抗(edrecolomab)、依法利珠单抗(efalizumab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、PEG化恩莫单抗(enlimomab pegol)、西依匹莫单抗(epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄利珠单抗(erlizumab)、埃达珠单抗(etaracizumab)、法索单抗(fanolesomab)、法拉莫单抗(faralimomab)、法勒珠单抗(farletuzumab)、加利昔单抗(galiximab)、加维莫单抗(gavilimomab)、吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)、维汀-格仑妥木单抗、戈利昔单抗(gomiliximab)、伊巴利珠单抗(ibalizumab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗(igovomab)、英妥木单抗(intetumumab)、伊妥木单抗(iratumumab)、伊诺莫单抗(inolimomab)、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、伊匹木单抗(ipilimumab)、凯利昔单抗(keliximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、林妥珠单抗(lintuzumab)、来沙木单抗(lexatumumab)、鲁卡木单抗(lucatumumab)、鲁昔单抗(lumiliximab)、马帕木单抗(mapatumumab)、马司莫单抗(maslimomab)、米拉妥珠单抗(milatuzumab)、明瑞莫单抗(minretumomab)、米妥莫单抗(mitumomab)、莫罗单抗(muromonab)-CD3、他那莫单抗(naptumomab estafenatox)、那他株单抗(natalizumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥度莫单抗(odulimomab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥拉单抗(olaratumab)、莫奥珠单抗(oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗(oregovomab)、奥昔珠单抗(otelixizumab)、喷妥莫单抗(pemtumomab)、普立昔单抗(priliximab)、PR0 140、利妥昔单抗(rituximab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、鲁利单抗(ruplizumab)、沙妥莫单抗喷地肽(satumomab pendetide)、

西利珠单抗(siplizumab)、索土珠单抗(sontuzumab)、他多赛珠单抗(tadocizumab)、帕他普莫单抗(taplutumomab paptox)、替奈昔单抗(teneliximab)、特普利珠单抗(teplizumab)、TGN1412、替西木单抗(ticilimumab)(=曲美木单抗(tremelimumab))、替加珠单抗(tigatuzumab)、托西珠单抗(tocilizumab)(=atlizumab)、托利珠单抗(toralizumab)、托西莫单抗(tositumomab)、曲美木单抗(tremelimumab)、妥考妥珠单抗、维多株单抗(vedolizumab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、维西珠单抗(visilizumab)、vitaxin、伏洛昔单抗(volociximab)、伏妥莫单抗(votumumab)、扎木单抗(zanolimumab)、齐拉木单抗(ziralimumab)、阿佐莫单抗(zolimomab aritox)。阿特殊单抗(Atezolizumab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)(Avastin®)、地诺单抗(denosumab)、地努图希单抗(dinutuximab)、纳武单抗(nivolumab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、皮地利珠单抗(pidilizumab)(CT-011)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、司妥昔单抗(siltuximab)、曲妥珠单抗-美坦新偶联物(ado-trastuzumab emtansine)、CEA-scan Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C、MEDI4736、或其抗原结合片段、其类似物或衍生物、或选自以下的抗原结合抗体片段:Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、单链Fv(scFv)或二硫化物稳定的Fv(dsFv)。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子包含由上述抗体或其抗原结合片段中任何一种识别的表位。

[0130] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是前列腺特异性膜抗原(PSMA)。PSMA是II型跨膜蛋白,其含有短的细胞质氨基末端、单个跨膜结构域和大的细胞外结构域。PSMA含有与包括共催化金属肽酶在内的肽酶家族M28蛋白展现相似度的氨基酸序列。野生型全长人PSMA是750个氨基酸的蛋白质,其包括19个氨基酸残基的细胞内部分、24个氨基酸残基的跨膜部分和707个氨基酸残基的细胞外部分。在人中,PSMA由FOLH1基因(例如,描述于GenBank登录号DD461260中(如SEQ ID NO:96中所示))及其同种型和变体编码。示例性的人PSMA氨基酸序列示于例如UniProt登录号Q04609中(如SEQ ID NO:94所示)。

[0131] 在一些情况下,PSMA的细胞外部分折叠成三个不同的结构和功能结构域:蛋白酶结构域(残基56-116和352-590)、顶端结构域(残基117-351)和C末端螺旋结构域(残基592-750),所述位置是参考野生型人PSMA序列(例如在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列)的位置(参见,例如Davis等人,(2005)Proc.Natl.Acad.Sci.102(17):5981-5986;Mesters等人,(2006)EMBO Journal 25:1375-1384)。

[0132] 在一些情况下,PSMA具有酶促活性或催化活性。在一些方面,PSMA中的特定结构域和/或残基参与酶促或催化活性。PSMA通常含有双核锌位点并且可以充当谷氨酸羧肽酶或叶酸水解酶,催化从聚- $\gamma$ -谷氨酸化叶酸中水解切割谷氨酸。PSMA还具有N-乙酰化 $\alpha$ 连接的酸性二肽酶(NAAADase)活性和二肽基肽酶IV型活性。酶促位点含有两个锌离子,并且由两个口袋构成,即谷氨酸敏感口袋(S1'口袋)和非药效团口袋(S1口袋)。来自三个结构域的氨基酸残基通常参与底物识别、结合和/或催化活性。在一些情况下,参考野生型人PSMA序列(例如,在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列)的位置,活性位点残基和/或在PSMA中参与底物结合和/或催化活性的残基包括在位置210、257、269、272、377、387、387、424、424、425、433、436、453、517、518、519、552、553、534、535、536、552、553、628、666、689、699和/或700处的氨基酸残基。在一些情况下,活性位点残基包括一个或多个残基来配位活性锌离子,如参考示例性人PSMA序列(例如在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列)的位置与His377、

Asp387、Glu425、Asp453和/或His553对应的一个或多个残基。在一些实施方案中,PSMA的N-乙酰化 $\alpha$ 连接的酸性二肽酶 (NAALADase) 结构域也可以被定义为包括氨基酸残基274-587,所述位置是参考示例性人PSMA序列 (例如在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列) 的位置 (Speno等人, (1999) *Molecular Pharmacology* 55:179-185)。

[0133] 在一些方面,PSMA的细胞内 (N末端) 部分含有参与细胞内化 (例如分子的网格蛋白依赖性内吞内化) 的氨基酸残基。在一些方面,细胞内化由以下N末端氨基酸介导:例如在SEQ ID NO:94中所示的示例性人PSMA氨基酸序列的位置1-5处的氨基酸残基 (例如,MWNLL; 参见,例如Rajasekaran等人 (2003) *Mol. Biol. Cell.* 14:4835-4845)。在一些方面,PSMA的细胞内部分含有基序或残基,所述基序或残基能够在发出分子或细胞信号 (如用于分子内化) 时在细胞中被磷酸化和/或与信号转导途径或下游过程中的一种或多种衔接子蛋白相互作用。在一些实施方案中,示例性基序包括基于二亮氨酸的基序 (例如,LL)。

[0134] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是PSMA,如哺乳动物PSMA,例如人PSMA。在一些实施方案中,所述参考表面分子是野生型PSMA,任选地野生型人PSMA,或其等位基因变体或其他变体,例如,其替代性同种型或片段。在一些实施方案中,所述PSMA是全长PSMA。在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子含有在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:94至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述PSMA包含在SEQ ID NO:94中所示的序列或基本上由其组成。

[0135] 在一些实施方案中,所述PSMA由SEQ ID NO:96中所示的核酸序列或展现与SEQ ID NO:96至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的核酸序列编码。在一些实施方案中,所述PSMA由经修饰的核酸序列 (例如,被修饰为不含CpG和/或被密码子优化的核酸序列) 编码。在一些实施方案中,经修饰的核酸序列被密码子优化以在人细胞中表达。在一些方面,密码子优化涉及平衡所选择的密码子的百分比与公开的人转移RNA的丰度,使得没有任何一者超负荷或受限。在一些实施方案中,编码PSMA的不含CpG的核酸序列是或包括不含有CpG序列的经修饰的cDNA序列。在一些方面,与野生型或未经修饰的PSMA相比,不含CpG的核酸和/或密码子优化的序列不会改变蛋白质序列。在一些实施方案中,参考PSMA由SEQ ID NO:97中所示的核酸序列编码。在一些方面,由不含CpG的PSMA编码的PSMA与在SEQ ID NO:94中所示的蛋白质序列具有显著的百分比同一性。

[0136] 在一些实施方案中,所述参考细胞表面分子是PSMA,其包含由抗体或其抗原结合片段识别的表位,所述抗体或其抗原结合片段包括但不限于J591、DF0-J591、CYT-356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107-1A4、YPSMA-1、YPSMA-2、3E6、2G7、24.4E6、GCP-02、GCP-04、GCP-05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7-Fc、D7-CH3、4D4、A5、或其抗原结合片段、其类似物或衍生物、或选自以下的抗原结合抗体片段:Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、单链Fv (scFv) 或二硫化物稳定的Fv (dsFv)。在一些实施方案中,示例性抗体或其抗原结合片段包括在以下文献中描述的那些、或其片段、其缀合物或其衍生物:US 2002/0049712;US 2002/0147312;US 2003/0082187;US 2004/0136998;US 2005/0202020;US 2006/0088539;US 2007/0071759;US 2010/0297653;US 2011/0020273;US 2013/0225541;US 2013/0315830;US 2014/0099257;US 2014/0227180;US 2015/0168413;US 2016/0303253;US 2017/

0051074;US 6572856;US 7476513;US 8470330;US 8986655;WO 2006/078892;WO 2010/135431;WO 2014/198223;WO 2015/177360;WO 2016/057917;WO 2016/130819;WO 2016/145139;WO 2016/201300;WO 2017/004144;WO 2017/023761;AU 2002/356844;AU 2006/204913;AU 2006/235421;AU 2006/262231;AU 2006/315500;AU 2010/325969;AU 2013/328619;AU 2015/205574;CA 2353267;EP 1390069;EP 1520588;EP 1581794;EP 1599228;EP 1610818;EP 2906250;Banerjee等人(2011)Angew Chem Int Ed Engl.50(39):9167-9170;Maurer等人(2016)Nature Reviews Urology 13:226-235;Rowe等人(2016)Prostate Cancer Prostatic Dis.19(3):223-230;Mease等人,(2013)Curr Top Med Chem.13(8):951-962;Osborne等人,(2013)Urol Oncol.31(2):144-154;Philipp Wolf(2011), Prostate Specific Membrane Antigen as Biomarker and Therapeutic Target for Prostate Cancer,Prostate Cancer-Diagnostic and Therapeutic Advances, Dr.Philippe E.Spiess (编辑),Intech,第81-100页;Ruggiero等人,(2011)J Nucl Med.52(10):1608-1615;Liu等人,(1997)Cancer Research57:3629-3634;Regino等人,(2009)Curr Radiopharm.January;2(1):9-17;Kampmeier等人(2014)EJNMMI Research 4:13;Wolf等人,(2010)The Prostate 70:562-569;Tykvart等人(2014)The Prostate 74:1674-1690;Jin等人,(2016)EMJ Urol.4(1):62-69以及Tino等人(2000)Hybridoma 19(3):24957。

[0137] 1. 示例性经修饰的细胞表面分子

[0138] 在一些实施方案中,与参考细胞表面分子相比,经修饰的细胞表面分子含有一个或多个氨基酸修饰,如一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子(如经修饰的细胞表面受体)被修饰以去除任何信号传导和/或运输结构域。在一些情况下,经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。在一些实施方案中,与野生型或未经修饰的细胞表面分子相比,经修饰的细胞表面分子(例如经修饰的细胞表面受体)展现改变的细胞内化、细胞运输、酶促活性和/或配体结合。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子含有和/或保留由结合分子识别和/或结合的表位,所述结合分子是例如对细胞表面分子具特异性的抗体或其抗原结合片段和/或能够结合细胞表面分子的配体。

[0139] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸修饰(如一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入,包括截短)可以存在于细胞表面分子的一个或多个细胞内(例如,细胞质)和/或细胞外部分。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子被截短,例如通过连续缺失参考细胞表面分子的C末端或N末端氨基酸残基的连续序列,例如缺失参考细胞表面分子的从或从约50个至800个氨基酸,如50个至600个,例如至少或约至少50个、60个、70个、80个、90个、100个、200个、300个、400个、500个、600个或更多个连续氨基酸。在一些方面,经修饰的细胞表面分子被截短,例如通过缺失蛋白质的细胞内(例如,细胞质)部分的连续氨基酸残基,例如,存在于I型膜蛋白的C末端部分或在II型膜蛋白的N末端部分。在一些方面,经修饰的细胞表面分子被截短,例如通过缺失蛋白质的细胞外结构域或部分的连续氨基酸残基,例如,存在于I型膜蛋白的N末端部分或II型膜蛋白的C末端部分。

[0140] 在一些实施方案中,细胞表面分子包含一个或多个细胞外结构域或区域,并且所述修饰在细胞表面分子的细胞外部分中。在一些方面,细胞表面分子的细胞外部分的示例



性修饰可以去除参与表位结合、酶促活性和/或配体结合和/或信号传导或功能的结构域或区域。在一些方面,细胞表面分子的细胞外部分的示例性修饰包含和/或保留由结合分子识别和/或结合的一个或多个表位,所述结合分子是例如对细胞表面分子具特异性的抗体或其抗原结合片段和/或能够结合细胞表面分子的配体。在一些方面,细胞表面分子的细胞外部分的示例性修饰生成经修饰的细胞表面分子,所述经修饰的细胞表面分子展现与参考细胞表面分子相比改变的酶促活性和/或配体结合。

[0141] 在一些实施方案中,细胞表面分子包含一个或多个细胞内和/或细胞质结构域或区域,并且所述修饰在细胞表面分子的细胞内(例如,细胞质)部分中。在一些方面,细胞表面分子的细胞内(例如,细胞质)部分的修饰(例如,取代、缺失、截短和/或插入)可以去除参与引发、介导、激活、抑制和/或传递细胞信号传导和/或下游活性或功能(例如基因和蛋白质表达、分子亚细胞定位的变化、细胞内运输、蛋白质-蛋白质相互作用的变化、受体内化、细胞分化、增殖和/或存活)的结构域或区域。在一些方面,细胞表面分子的细胞内(例如,细胞质)部分的修饰生成经修饰的细胞表面分子,所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导和/或展现改变的功能或活性(例如,改变的细胞内化和/或细胞运输)。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子引发、介导、激活、抑制和/或传递与参考细胞表面分子的细胞表面分子相关的细胞信号传导和/或调节(regulating或modulating)活性和/或功能的能力被降低了大于或大于约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子(如经修饰的细胞表面受体)是惰性的,不能引发或介导细胞内信号。

[0142] 在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子保留参考细胞表面分子的跨膜结构域和参考细胞表面分子的至少一个细胞外结构域。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子含有在SEQ ID NO:49-54或94中任一个中所示的氨基酸序列,但缺乏(例如被截短或缺失)与SEQ ID NO:49-54或94中任一个的细胞质结构域对应的氨基酸残基。

[0143] 在一些实施方案中,改变了所提供的缀合物的经修饰的细胞表面分子结合参考细胞表面分子的天然配体的能力。例如,在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子结合参考细胞表面分子的天然配体的能力被降低和减弱了。在一些实施方案中,细胞表面分子被修饰以含有参考细胞表面分子的至少一个细胞外结构域,但缺乏由参考细胞表面分子的天然配体识别的一个或多个其他细胞外结构域。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子与参考细胞表面分子的配体的结合被减少了大于或大于约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。

[0144] 在一些实施方案中,与参考细胞表面分子相比,经修饰的细胞表面分子(如经修饰的细胞表面受体)被修饰或截短,以保留含有由已知抗体或其功能片段识别的细胞外表位的结合结构域。因此,在一些实施方案中,这种细胞表面分子的修饰通过保持在细胞外结构域中存在的由已知抗体或其功能片段识别的表位并且去除不由已知抗体识别的任何信号传导或运输结构域和/或任何细胞外结构域来实现。经修饰的细胞表面分子可以包括如所描述的任何经修饰的细胞表面分子,其保留与上面描述的示例性抗体和抗原结合片段中的一种或多种的结合,例如展现与参考细胞表面分子相同或相似的结合。

[0145] 在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子是经修饰的或截短的酪氨酸激酶受体。可以根据本文描述的实施方案进行修饰的酪氨酸激酶受体的例子包括但不限于内皮生

长因子受体家族的成员 (EGRF/ErbB1/HER1;ErbB2/HER2/neu;ErbB3/HER3;ErbB4/HER4)、肝细胞生长因子受体 (HGFR/c-MET) 和胰岛素样生长因子受体-1 (IGF-1R)。根据一些实施方案,所提供的细胞表面缀合物含有经修饰的酪氨酸激酶受体,所述经修饰的酪氨酸激酶受体保留了由已知抗体或其功能片段识别的细胞外表位,并且缺乏含有至少一个酪氨酸激酶结构域的细胞质结构域或其功能蛋白。缺乏至少一个酪氨酸激酶结构域经修饰的酪氨酸激酶受体使得所述受体呈惰性。可以用于识别经修饰的酪氨酸激酶受体的商业抗体包括但不限于AMG-102、AMG-479、BIIB0220A-5D5、CP-751,871、IMC-A12、R1507、西妥昔单抗、西妥木单抗 (cixutumumab)、厄妥索单抗 (ertumaxomab)、芬妥木单抗 (figitumumab)、马妥珠单抗 (matuzumab)、耐昔妥珠单抗 (necitumumab)、帕尼单抗 (panitumumab)、帕妥珠单抗 (pertuzumab)、尼妥珠单抗 (nimotuzumab)、罗妥木单抗 (robatumumab)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、扎鲁木单抗 (zalutumumab)。

[0146] 在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子是经修饰的前列腺特异性膜抗原 (PSMA)。可以用于识别经修饰的酪氨酸激酶受体的抗体包括但不限于J591、DF0-J591、CYT-356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107-1A4、YPSMA-1、YPSMA-2、3E6、2G7、24.4E6、GCP-02、GCP-04、GCP-05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7-Fc、D7-CH3、4D4和A5。

[0147] 细胞表面缀合物的示例性细胞表面分子的非限制性例子示于表1中。

[0148] 在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子与具有SEQ ID NO:49-54或94中任一个中所示的氨基酸序列的参考细胞表面分子相比被修饰,其中经修饰的细胞表面分子至少含有参考细胞表面分子的细胞外结构域和跨膜结构域的一部分但缺乏 (例如被截短或缺失) 与这种参考细胞表面分子的细胞质结构域对应的氨基酸残基。在一些实施方案中,例如经修饰的细胞表面分子还缺乏用于结合细胞表面分子的天然配体 (如在表1中所示的天然配体) 的一个或多个细胞外配体结合结构域。在一些实施方案中,这样的经修饰的细胞表面分子展现减少的 (例如减少了大于20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多) 对参考细胞表面分子的天然配体的结合。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子保留了至少一个细胞外结构域,所述至少一个细胞外结构域含有对参考细胞表面分子特异的已知抗体的表位,如在表1中列出的或本文 (例如在章节II.A中) 描述的抗体的表位。

[0149]

表1: 示例性细胞表面分子			
参考细胞表面分子	SEQ ID NO	天然配体	抗体

[0150]

表1：示例性细胞表面分子				
参考细胞表面分子	SEQ ID NO		天然配体	抗体
	前体	成熟		
HER1/ErbB1/EGFR	64	49	EGF、β细胞素（betacellulin）、TGFα、HB-EGF、双调蛋白、上皮调节蛋白、上皮细胞有丝分裂蛋白（epigen）	西妥昔单抗、帕尼单抗、马妥珠单抗、耐昔妥珠单抗、尼妥珠单抗、扎鲁木单抗
HER2/neu/ErbB2	65	50	单独没有配体结合活性 神经调节蛋白（具有HER4） EGF与EGFR	曲妥珠单抗、2C4、厄妥索单抗、帕妥珠单抗
HER3/ErbB3	66	51	Hergulin（NRG-1）、NRG-2	帕曲妥单抗（Patritumab）
HER4/ErbB4	67	52	NRG-2、NRG-3、结合肝素的EGF样生长因子、β细胞素	
HGFR/c-Met	68	53	HGF	DN30/ OA-5D5/ AMG 102/ 依米妥珠单抗（emibetuzumab）

[0151]

表1：示例性细胞表面分子				
参考细胞表面分子	SEQ ID NO		天然配体	抗体
IGF-1 R	69	54	IGF-1、胰岛素	CP-751,871、芬妥木单抗、西妥木单抗、达洛妥珠单抗 (dalotuzumab)、盖尼塔单抗 (Ganitumab)、R1507
PSMA WT (全长)		94	天然底物：N-乙酰天冬氨酸谷氨酸 (NAAG)、三- $\alpha$ -谷氨酸肽、和聚- $\gamma$ -谷氨酰叶酸	J591、DFO-J591、CYT-356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107-1A4、YPSMA-1、YPSMA-2、3E6、2G7、24.4E6、GCP-02、GCP-04、GCP-05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7-Fc、D7-CH3、4D4、A5

[0152] a. 经修饰的EGFR，例如截短的EGFR

[0153] 在一些实施方案中，细胞表面分子是经修饰的EGFR，所述经修饰的EGFR与参考EGFR (如参考人EGFR，例如在SEQ ID NO:64中所示的参考EGFR或在SEQ ID NO:49中所示的其成熟序列) 相比被修饰或改变。参考天然EGFR的结构含有四个细胞外结构域 (结构域I-IV，分别对应于SEQ ID NO:64的残基35-206、207-333、334-499和500-645)、跨膜结构域 (对应于SEQ ID NO:64的残基646-668) 和细胞质结构域 (对应于SEQ ID NO:64的残基669-1210) (其中在其中包含EGFR近膜结构域 (对应于SEQ ID NO:64的残基669-712) 和EGFR酪氨酸激酶结构域 (对应于SEQ ID NO:64的残基713-982))。

[0154] 在一个实施方案中，经修饰的细胞表面分子是截短的EGFR (tEGFR)，其缺乏膜远端

EGF结合结构域和含有酪氨酸激酶结构域的细胞质信号传导尾部,但保留了跨膜结构域和由已知抗体或其功能片段(例如,西妥昔单抗、马妥珠单抗、耐昔妥珠单抗、尼妥珠单抗、扎鲁木单抗或帕尼单抗)识别的细胞外膜近端表位。在一些实施方案中,当被T细胞表达时,EGF结合结构域和细胞内信号传导结构域的缺乏使得EGFR失活(惰性)。

[0155] 在一些实施方案中,经修饰的EGFR缺乏参考EGFR的结构域I、结构域II、近膜结构域和酪氨酸激酶结构域中的一个或多个。在一些情况下,经修饰的EGFR缺乏参考EGFR的结构域I、结构域II、近膜结构域和酪氨酸激酶结构域中的全部。在一些情况下,经修饰的EGFR缺乏结构域I、结构域II和细胞质结构域中的全部。在此类实施方案中,经修饰的EGFR含有或基本上含有参考EGFR的结构域III和IV。在一些实施方案中,例如经修饰的EGFR保留了由已知抗体或其功能片段识别的表位。

[0156] 在一些实施方案中,经修饰的EGFR包含在SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列或在SEQ ID NO:46中所示的其成熟形式、或展现与SEQ ID NO:44或46至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列中包含的氨基酸,其中所述经修饰的EGFR缺乏EGF结合结构域,保留了由已知抗体识别的表位并且缺乏这种参考EGFR的细胞质信号传导结构域的全部或功能部分。可以识别经修饰的EGFR上的表位的结合分子的示例包括FDA批准的抗EGFR单克隆抗体(mAb)西妥昔单抗或另一种抗EGFR抗体。

[0157] 在一些实施方案中,经修饰的EGFR(如tEGFR)由在SEQ ID NO:57中所示的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:57至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列(如其含有简并密码子的序列)编码。编码的经修饰的EGFR可以含有用于表达为表面分子或表面蛋白的信号肽。在一些实施方案中,经修饰的EGFR(如tEGFR)由如下核苷酸编码,所述核苷酸含有编码在SEQ ID NO:64中包含的参考EGFR天然信号肽的序列。在一些实施方案中,经修饰的EGFR(如tEGFR)由如下核苷酸编码,所述核苷酸含有编码例如在SEQ ID NO:48中所示的非天然或异源信号肽的序列。在一些实施方案中,经修饰的EGFR由在SEQ ID NO:45中所示的核苷酸序列或与SEQ ID NO:45至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列(如其含有简并密码子的序列)编码。

[0158] b. 经修饰的Her2,例如截短的Her2

[0159] 在一些实施方案中,细胞表面分子是经修饰的HER2/neu/ErbB2,所述经修饰的HER2/neu/ErbB2与参考HER2/neu/ErbB2(如参考人HER2/neu/ErbB2,例如在SEQ ID NO:65中所示的参考HER2/neu/ErbB2或在SEQ ID NO:50中所示的其成熟序列)相比被修饰或改变。参考天然HER2/neu/ErbB2的结构含有细胞外结构域(对应于SEQ ID NO:65的残基23-652)、跨膜结构域(对应于SEQ ID NO:65的残基653-675)、和细胞质结构域(对应于SEQ ID NO:65的残基676-1255)。参考天然HER2/neu/ErbB2细胞外结构域的结构含有分别与SEQ ID NO:50的残基1-195、196-319、320-488和489-630对应的结构域I-IV(美国专利申请公开号US 2014/0186867和美国专利号US 7,449,184)。

[0160] 在一个实施方案中,经修饰的细胞表面分子是截短的HER2/neu/ErbB2(HER2t),其缺乏细胞质结构域,但保留了跨膜结构域和由已知抗体或其功能片段(例如曲妥珠单抗、2C4、厄妥索单抗、帕妥珠单抗)识别的细胞外膜近端表位。在一些实施方案中,当被T细胞表

达时,配体结合结构域和细胞内信号传导结构域的缺乏使得HER2/neu/ErbB2失活(惰性)。

[0161] 在一些实施方案中,经修饰的HER2/neu/ErbB2缺乏参考HER2/neu/ErbB2的结构域I、结构域II和结构域III中的一个或多个。在一些情况下,经修饰的HER2/neu/ErbB2缺乏参考HER2/neu/ErbB2的全部细胞外结构域。在一些情况下,经修饰的HER2/neu/ErbB2缺乏全部细胞外和细胞质结构域。在此类实施方案中,经修饰的HER2/neu/ErbB2含有或基本上含有参考HER2/neu/ErbB2的保留的结构域IV、和跨膜结构域。在一些实施方案中,例如经修饰的HER2/neu/ErbB2保留了由已知抗体或其功能片段识别的表位。

[0162] 在一些实施方案中,经修饰的HER2/neu/ErbB2包含在SEQ ID NO:92中所示的氨基酸序列、或展现与SEQ ID NO:92至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列中包含的氨基酸,其中所述经修饰的HER2/neu/ErbB2缺乏配体结合结构域,保留了由已知抗体识别的表位并且缺乏这种参考HER2/neu/ErbB2的细胞质信号传导结构域的全部或功能部分。在一些实施方案中,配体结合结构域可以与EGF、转化生长因子 $\alpha$  (TGF $\alpha$ )、双调蛋白、结合肝素的EGF样生长因子、 $\beta$ 细胞素和上皮调节蛋白结合。可以识别经修饰的HER2/neu/ErbB2上的表位的结合分子的示例包括FDA批准的抗HER2单克隆抗体(mAb)曲妥珠单抗、2C4、厄妥索单抗、帕妥珠单抗或另一种抗HER2/neu/ErbB2抗体。在一些实施方案中,所述结合分子可以识别经修饰的HER2/neu/ErbB2的结构域IV中的表位(曲妥珠单抗),或者可以识别经修饰的HER2/neu/ErbB2的结构域II中的表位(帕妥珠单抗)。

[0163] 在一些实施方案中,经修饰的HER2/neu/ErbB2(如HER2t)由在SEQ ID NO:91中所示的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:91至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列(如其含有简并密码子的序列)编码。编码的经修饰的HER2/neu/ErbB2可以含有用于表达为表面分子或表面蛋白的信号肽。在一些实施方案中,经修饰的HER2/neu/ErbB2(如HER2t)由如下核苷酸编码,所述核苷酸含有编码在SEQ ID NO:65中包含的参考HER2/neu/ErbB2天然信号肽的序列。在一些实施方案中,经修饰的HER2/neu/ErbB2(如HER2t)由如下核苷酸编码,所述核苷酸含有编码例如在SEQ ID NO:48中所示的非天然或异源信号肽的序列。在一些实施方案中,经修饰的HER2/neu/ErbB2由在SEQ ID NO:93中所示的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:93至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列(如其含有简并密码子的序列)编码。

[0164] c. 经修饰的PSMA,例如截短的PSMA

[0165] 在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子是经修饰的前列腺特异性膜抗原(PSMA)。在一些实施方案中,与参考细胞表面分子相比,经修饰的细胞表面分子被修饰,所述参考细胞表面分子是PSMA,如野生型或未经修饰的PSMA,例如人PSMA,例如含有SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,与参考PSMA相比,经修饰的PSMA含有一个或多个氨基酸修饰,如一个或多个氨基酸取代、缺失、截短和/或插入。在一些实施方案中,与参考、野生型或未经修饰的PSMA相比,经修饰的PSMA展现改变的细胞内化、细胞运输、酶促活性和/或配体结合。

[0166] 在一些实施方案中,经修饰的PSMA包含野生型或未经修饰的PSMA的全部或基本上全部的跨膜结构域;或者经修饰的PSMA包含具有与野生型或未经修饰的PSMA相同或至少相

同数量的氨基酸的跨膜结构域。在一些实施方案中,PSMA包含细胞外结构域,所述细胞外结构域含有由本文描述的结合PSMA的任何抗体或其抗原结合片段识别的表位。

[0167] 在一些实施方案中,参考、野生型或未经修饰的PSMA是人PSMA和/或包含在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,经修饰的PSMA含有在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列的细胞外结构域和/或跨膜结构域或其部分或片段。

[0168] 在一些实施方案中,经修饰的PSMA包含至少一个氨基酸取代,例如在第二氨基酸残基处,其中色氨酸被甘氨酸取代(对应于W2G,参考SEQ ID NO:94中所示的PSMA中的位置)。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列中的位置,经修饰的PSMA包含与W2G对应的至少一个氨基酸取代或者不包含W2或者不包含在位置2处的任何残基。例如,在一些实施方案中,经修饰的PSMA包含在SEQ ID NO:95中所示的氨基酸序列或其片段,或展现与SEQ ID NO:95至少为或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列或其片段,并且包含所述至少一个氨基酸取代。

[0169] 在一些实施方案中,置,经修饰的PSMA包含在位置2、3、4、5、6、7、8、9、10或14处(参考在SEQ ID NO:94中所示的PSMA序列中的位)的一个或多个氨基酸残基处的氨基酸取代(至丙氨酸)。

[0170] 在一些实施方案中,与野生型或未经修饰的PSMA相比,PSMA是经修饰的PSMA,其包含细胞内部分中的一个或多个N末端氨基酸残基的缺失。野生型全长人PSMA是750个氨基酸的蛋白质,其包括19个氨基酸残基的细胞内部分、24个氨基酸残基的跨膜部分和707个氨基酸残基的细胞外部分。例如,在一些实施方案中,经修饰的PSMA含有在N末端处的缺失(对应于编码PSMA或其修饰形式的核酸序列中的编码序列的5'末端),所示缺失在PSMA的细胞内部分中。

[0171] 在一些方面,在细胞内部分中含有一个或多个缺失的经修饰的PSMA也被称为PSMA的截短形式、截短的PSMA或tPSMA。在一些方面,截短的PSMA或tPSMA含有在野生型或未经修饰的PSMA的N末端处或附近的一个或多个氨基酸残基(任选地连续的氨基酸残基)的缺失或截短。在一些方面,经修饰的PSMA含有在PSMA的细胞内部分或结构域内一个或多个氨基酸残基(例如,一个或多个连续的氨基酸残基)的缺失或截短。在一些实施方案中,含有N末端氨基酸的缺失的PSMA蛋白允许经N末端修饰的PSMA成功定位于细胞膜和中心体,和/或与野生型或未经修饰的PSMA相比(i)展现减少的内源信号传导;(ii)展现增加的细胞表面表达;和/或(iii)展现减少的细胞内化。在一些实施方案中,经修饰的PSMA展现减少的内源信号传导或减少的细胞内化,例如,减少了大于或大于约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在一些实施方案中,经修饰的PSMA展现增加的细胞表面表达或增加的向细胞膜和中心体的定位,例如增加了大于或大于约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在一些方面,可以使用细胞成像技术(如使用特异性结合PSMA或其变体的标记的结合分子(例如,抗体)的共聚焦显微镜)来评估细胞表面表达和/或细胞内化。

[0172] 在一些实施方案中,经修饰的PSMA含有或保留甲硫氨酸作为第一残基,其在一些情况下是翻译所必需的。在一些实施方案中,与野生型或未经修饰的PSMA相比,PSMA是经修饰的PSMA,所述经修饰的PSMA包含细胞内部分中的一个或多个N末端氨基酸残基(任选地连续的氨基酸残基)的缺失,但不包括翻译所必需的初始甲硫氨酸的缺失。

[0173] 在一些实施方案中,PSMA或经修饰的PSMA包括在以下文献中描述的PSMA:例如,国际PCT公开号W0 2015143029,Rajasekaran等人(2003) Mol. Biol. Cell. 14:4835-4845, Rajasekaran等人(2008) Mol. Cancer Ther. (2008) 7 (7):2142-2151, Barinka等人(2004) Eur. J. Biochem. 271:2782-2790,以及Davis等人(2005) Proc. Natl. Acad. Sci. 102 (17)-5981-5986。

[0174] 在一些实施方案中,参考在野生型或未经修饰的PSMA(例如,在SEQ ID NO:94中所示的PSMA序列)中的位置,经修饰的PSMA含有11个N末端氨基酸和/或前11个氨基酸的缺失或缺乏11个N末端氨基酸和/或前11个氨基酸。在一些实施方案中,参考在野生型或未经修饰的PSMA(例如,在SEQ ID NO:94中所示的PSMA序列)中的位置,经修饰的PSMA含有15个N末端氨基酸的缺失或缺乏15个N末端氨基酸。在一些实施方案中,参考在野生型或未经修饰的PSMA(例如,在SEQ ID NO:94中所示的PSMA序列)中的位置,经修饰的PSMA含有氨基酸N末端氨基酸6-14的缺失或缺乏氨基酸N末端氨基酸6-14。

[0175] 在一些实施方案中,经修饰的PSMA包含一个或多个C末端氨基酸残基的缺失。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:94中所示的PSMA中的位置,经修饰的PSMA包含氨基酸残基103-750、626-750、721-747或736-750的缺失。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:94中所示的PSMA中的位置,经修饰的PSMA包含15个C末端氨基酸残基的缺失。

[0176] 在一些实施方案中,经修饰的PSMA由经修饰的核酸序列(例如,被修饰为不含CpG和/或被密码子优化的核酸序列)编码。

[0177] B. 药剂(例如亲和标签)

[0178] 在细胞表面缀合物的一些实施方案中,细胞表面分子(如经修饰的细胞表面分子)与至少一种药剂连接。在一些实施方案中,所述药剂是肽或多肽。在一些实施方案中,所述药剂是肽。在一些实施方案中,所述肽是人工的、合成的或是较长多肽的一部分。肽的长度通常为大于或等于2个氨基酸,如长度为大于或等于2个且小于或等于50个或40个氨基酸的一种肽。在一些实施方案中,所述肽在7个与40个氨基酸之间、8个与20个氨基酸之间、10个与17个氨基酸之间、7个与13个氨基酸之间或8个与10个氨基酸之间。在一些实施方案中,所述肽具有在7个与20个氨基酸之间的长度。在一些实施方案中,所述肽具有7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸的长度。

[0179] 在一些实施方案中,所述药剂是已知由结合分子识别的亲亲和标签。在一些实施方案中,所述亲和标签具有足够的残基以提供由抗体或由非抗体结合分子识别的表位,但是,在一些方面,是足够短的使得其不会干扰或空间阻断由如上所述的已知抗体识别的细胞表面分子的表位。合适的标签多肽通常具有至少5个或6个氨基酸残基,并且通常在约8个-50个氨基酸残基之间,典型地在9个-30个残基之间。此类标签是熟知的并且可以容易地合成和设计。

[0180] 在一些实施方案中,所述药剂(如亲和标签)是链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签)、寡聚组氨酸或多组氨酸(例如His标签)、MAT标签、谷胱甘肽-S-转移酶、免疫球蛋白结构域、钙调蛋白或其类似物、硫氧还蛋白、几丁质结合蛋白(CBP)、钙调蛋白结合肽(CBP)、FLAG-肽、HA-标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)、HSV表位(例如gd标签)、myc表位、和/或生物素化的载体蛋白。此类药剂(如亲和标签)的示例包括MAT标签(序列:His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys)(SEQ ID NO:63)、HA-标签(序列:Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-



Asp-Tyr-Ala) (SEQ ID NO:20)、VSV-G-标签(序列:Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys) (SEQ ID NO:21)、HSV-标签(序列:Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp) (SEQ ID NO:22)、T7表位(Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly) (SEQ ID NO:22)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、单纯性疱疹病毒糖蛋白D的HSV表位(序列Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp(SEQ ID NO:24))、转录因子c-myc的“myc”表位(序列Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu(SEQ ID NO:25))、V5-标签(序列:Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) (SEQ ID NO:26)、或谷胱甘肽-S-转移酶(GST)。此类药剂(例如亲和标签)的示例还可以包括链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签),如包含在SEQ ID NO:7-19中任一个中所示的序列的任何一种。已知识别此类标签的结合分子是已知的,并且包括但不限于用于识别流感血凝素(HA)标签多肽的抗体12CA5(Field等人(1988)Mol.Cell.Biol.5:2159-2165);用于识别c-myc标签的8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10抗体(参见,例如,Evan等人(1985)Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616);以及用于识别单纯性疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签的已知抗体及其抗体(Paborsky等人(1990)Protein Engineering 3:547-553)、或识别链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签)的任何已知结合分子(如包含链霉亲和素突变蛋白(例如Strep-Tactin)的抗体分子或试剂)。

[0181] 药剂的另外的例子包括但不限于二硝基苯酚或地高辛、凝集素、蛋白质A、蛋白质G、金属、金属离子、次氨基三乙酸衍生物(NTA)、RGD-基序、葡聚糖、聚乙烯亚胺(PEI)、氧化还原聚合物、糖蛋白、适体、染料、直链淀粉、麦芽糖、纤维素、几丁质、谷胱甘肽、钙调蛋白、明胶、多粘菌素、肝素、NAD、NADP、赖氨酸、精氨酸、苯甲胺、聚U、或寡聚-dT。凝集素如伴刀豆凝集素A已知结合多糖和糖基化蛋白。染料的说明性例子是三嗪染料(如Cibacron blue F3G-A(CB)或Red HE-3B),其特异性结合NADH依赖性酶。通常,Green A结合CoA蛋白、人血清白蛋白、和脱氢酶。在一些情况下,染料7-氨基放线菌素D和4',6-二脒基-2-苯基咪唑结合DNA。

[0182] 在一些实施方案中,所述药剂(例如肽)(如亲和标签)由结合分子识别,其中平衡解离常数( $K_D$ )为从或从约 $10^{-4}M$ 至 $10^{-10}M$ 或平衡缔合常数( $K_A$ )为从或从约 $10^4M^{-1}$ 至 $10^{10}M^{-1}$ 。在一些实施方案中,所述药剂(如亲和标签,例如肽)由具有低结合亲和力(例如 $K_D$ 大于或大于约 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 或更大,或者 $K_A$ 为小于或小于约 $10^7M^{-1}$ 、 $10^6M^{-1}$ 、 $10^5M^{-1}$ 、 $10^4M^{-1}$ 或更小)的结合分子识别。

[0183] 在一些实施方案中,所述药剂(如亲和标签)由结合分子识别,所述结合分子是或包含具有与所述药剂结合的至少一个结合位点Z的结合试剂。在一些实施方案中,所述结合位点Z是抗生物素蛋白或链霉亲和素或其突变蛋白或类似物的天然生物素结合位点,其中在单个分子中可以存在多达四个结合位点(例如含有四个结合位点Z的四聚体),由此同源四聚体可以含有多达4个相同的结合位点,即Z1,然而异源四聚体可以含有多达4个可能不同的结合位点,例如含有Z1和Z2。

[0184] 在一些实施方案中,所述药剂由结合分子识别,所述结合分子是或包含作为寡聚物或聚合物的试剂。在一些实施方案中,所述寡聚物或聚合物可以通过将蛋白质的单个分子按其天然存在的样子直接或间接地连接,或者通过将单体的单个分子或构成单个分子的亚基的复合物直接或间接地连接(例如,将蛋白质的二聚体、三聚体、四聚体等按其天然存

在的样子直接或间接地连接)而生成。例如,链霉亲和素或抗生物素蛋白的四聚体同源二聚体或异源二聚体可以称为相应的寡聚物或聚合物的单个分子或最小构成要素。在一些实施方案中,寡聚物或聚合物可以含有蛋白质的至少2个单个分子的连接(例如是2聚体),或者可以是蛋白质的单个分子(例如,单体、四聚体)的至少3聚体、4聚体、5聚体、6聚体、7聚体、8聚体、9聚体、10聚体、11聚体、12聚体、13聚体、14聚体、15聚体、16聚体、17聚体、18聚体、19聚体、20聚体、25聚体、30聚体、35聚体、40聚体、45聚体或50聚体。在一些情况下,寡聚物可以含有多个结合位点Z1,如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、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、31个、32个、33个、34个、35个、40个、45个、50个或更多个结合位点Z1。在一些实施方案中,寡聚物生成或产生自多个单个分子,所述多个单个分子可以是(例如链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的)异源四聚体,和/或生成或产生自多个两个或更多个不同的单个分子(例如链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的不同的同源四聚体),所述两个或更多个不同的单个分子在它们的结合位点Z(例如Z1和Z2)方面不同,在这种情况下多个不同的结合位点Z(例如Z1和Z2)可以存在于寡聚物中。例如,在一些情况下,寡聚物可以含有多个结合位点Z1和多个结合位点Z2,其组合可以包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、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、31个、32个、33个、34个、35个、40个、45个、50个或更多个组合的结合位点Z1和Z2。

[0185] 可以使用在本领域中已知的任何方法(如在公布的美国专利申请号US2004/0082012中描述的任何方法)来生成寡聚物。在一些实施方案中,所述寡聚物或聚合物含有两个或更多个单个分子,所述两个或更多个单个分子可以交联,如通过多糖或双功能接头。

[0186] 在一些实施方案中,所述寡聚物或聚合物通过多糖的存在下将单个分子或构成单个分子的亚基的复合物交联而获得。在一些实施方案中,寡聚物或聚合物可以通过将羧基残基引入多糖(例如葡聚糖)中来制备。在一些方面,所述试剂的单个分子(例如,单体、四聚体)可以使用常规碳二亚胺化学经由内部赖氨酸残基的伯氨基基团和/或游离N末端与葡聚糖骨架中的羧基基团偶联。在一些实施方案中,偶联反应以每摩尔葡聚糖约60摩尔的试剂单个分子(例如单体、四聚体)的摩尔比进行。

[0187] 在一些情况下,在所述药剂与所述至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是非共价相互作用。在一些实施方案中,在所述药剂与所述至少一个结合位点Z之间的结合相互作用(如非共价相互作用)是可逆的。在一些实施方案中,所述结合试剂含有能够可逆地结合所述药剂的多个结合位点。可以用于此类可逆系统的结合分子试剂在本领域中已有描述并且是已知的,参见例如美国专利号5,168,049;5,506,121;6,103,493;7,776,562;7,981,632;8,298,782;8,735,540;9,023,604;以及国际公开的PCT申请号WO 2013/124474和WO 2014/076277。

[0188] 在一些实施方案中,所述结合分子对所述药剂的识别是可逆的,例如在竞争物质的存在下被竞争。在一些实施方案中,所述药剂是其中可以在竞争物质的存在下介导可逆缔合的一种药剂,所述竞争物质是或含有也能够由所述药剂识别或结合的结合位点。在一些方面,竞争物质可以充当竞争者,因为在竞争物质与结合分子之间的结合亲和力高于在

结合分子和药剂之间的结合亲和力和/或因为竞争物质存在的浓度比药剂更高,从而分离和/或解离在药剂与结合分子之间的相互作用。在一些方面,在药剂与结合分子之间的可逆结合可以通过使表达细胞表面缀合物并被结合分子结合的细胞与竞争物质接触(例如通过将竞争物质添加到这样的细胞组合物中)来进行。

[0189] 在一些实施方案中,所述药剂是或包括对熟练技术人员而言已知的部分作为亲和标签。在一些此类实施方案中,结合分子是或包含作为相应结合配偶体的试剂,例如已知与亲和标签结合的抗体或抗体片段。在此类实施方案中,复合物在试剂的一个或多个结合位点Z之间形成,所述试剂可以是抗体或抗体片段,并且通过添加游离抗原(即游离肽(表位标签)或游离蛋白(如MBP或CBP))可以竞争性地破坏抗原。在一些实施方案中,亲和标签也可以是寡核苷酸标签。在一些情况下,这样的寡核苷酸标签可以例如用于与具有互补序列的寡核苷酸杂交,连接至所述试剂或包括在所述试剂中。

[0190] 在一些情况下,结合分子是或包含如下试剂,所述试剂含有能够结合过渡金属离子的至少两个螯合基团K,从而使得所述试剂能够结合寡聚组氨酸亲和标签、多聚体谷胱甘肽-S-转移酶、或生物素化的载体蛋白或其他药剂。通常,金属阳离子(如Ni、Cd、Zn、Co或Cu)通常用于结合亲和标签,如含有寡聚组氨酸的序列(包括六组氨酸或His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys标签(MAT标签;SEQ ID NO:63))、和N-甲基丙烯酰基-(L)-半胱氨酸甲酯。在一些实施方案中,在所述药剂(例如肽)(如亲和标签)与所述试剂的一个或多个结合位点Z之间的结合在二价、三价或四价阳离子的存在下发生。在这方面,在一些实施方案中,所述试剂包括通常通过合适的螯合剂保持的(例如络合的)二价、三价或四价阳离子。在一些实施方案中,所述药剂(例如肽)(如亲和标签)可以包括含有例如络合物、二价、三价或四价阳离子的部分。在一些此类实施方案中,所述药剂与所述试剂的一个或多个结合位点Z之间的结合可以通过金属离子螯合作用破坏。金属螯合可以例如通过添加EGTA或EDTA来完成。相应的金属螯合剂的例子包括但不限于乙二胺、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、N,N-双(羧甲基)甘氨酸(也称为次氨基三乙酸,NTA)、1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N',N'-四乙酸(BAPTA)、2,3-二巯基-1-丙醇(二巯基丙醇)、卟啉和亚铁血红素。例如,EDTA与大多数单价、二价、三价和四价金属离子形成络合物,如例如,银( $\text{Ag}^+$ )、钙( $\text{Ca}^{2+}$ )、锰( $\text{Mn}^{2+}$ )、铜( $\text{Cu}^{2+}$ )、铁( $\text{Fe}^{2+}$ )、钴( $\text{Co}^+$ )和锆( $\text{Zr}^{4+}$ ),而BAPTA对 $\text{Ca}^{2+}$ 具有特异性。作为说明性例子,本领域中使用的标准方法是在寡聚组氨酸标签与铜( $\text{Cu}^{2+}$ )、镍( $\text{Ni}^{2+}$ )、钴( $\text{Co}^{2+}$ )或锌( $\text{Zn}^{2+}$ )离子之间形成络合物,所述离子通过螯合剂次氨基三乙酸(NTA)呈现。

[0191] 在一些实施方案中,所述药剂(如亲和标签)包括钙调蛋白结合肽,并且所述结合分子试剂包括例如在美国专利5,985,658中描述的多聚体钙调蛋白。在一些实施方案中,所述药剂(如亲和标签)包括FLAG肽,并且所述结合分子试剂包括与FLAG肽(例如与如美国专利4,851,341中描述的单克隆抗体4E11结合的FLAG肽)结合的抗体。在一个实施方案中,所述药剂(如亲和标签)包括寡聚组氨酸标签,并且所述试剂包括结合所述寡聚组氨酸标签的抗体或过渡金属离子。在一些情况下,所有这些结合复合物的破坏可以通过金属离子螯合作用(例如,钙螯合作用,例如通过添加EDTA或EGTA)实现。在一些实施方案中,钙调蛋白、抗体如4E11或螯合金属离子或游离螯合剂可以通过常规方法多聚化,例如,通过与链霉素亲和素或抗生物素蛋白或其寡聚物的生物素化和络合,或者通过在第一步骤中基本上如

Noguchi, A等人Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137所描述的将羧基残基引入多糖(例如葡聚糖)中,并且在第二步骤中使用常规碳二亚胺化学将钙调蛋白或抗体或螯合的金属离子或游离螯合剂经由伯氨基与多糖(例如葡聚糖)骨架中的羧基基团连接。

[0192] 在一些情况下,所述结合分子是或包含如下试剂,所述试剂是链霉亲和素或抗生物素蛋白或链霉亲和素的任何类似物或突变蛋白或抗生物素蛋白的类似物或突变蛋白(例如中性抗生物素蛋白)。在一些实施方案中,结合分子试剂能够结合作为链霉亲和素结合肽的药剂。在一些实施方案中,可以用生物素或生物素类似物或模拟物进行结合的破坏或逆转。已知识别此类药剂的此类链霉亲和素结合肽和结合分子试剂的示例如下所述。

[0193] 1. 示例性链霉亲和素结合肽药剂及其的结合分子

[0194] 在一些实施方案中,药剂(例如肽)(如亲和标签)由是或包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的试剂识别。在一些实施方案中,所述药剂可以是生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽或能够特异性结合链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物的其他分子。在一些实施方案中,所述药剂(如亲和标签)是链霉亲和素结合肽。

[0195] 在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽含有具有在SEQ ID NO:9中所示的通式的序列,例如含有在SEQ ID NO:10中所示的序列。在一些实施方案中,肽序列具有在SEQ ID NO:11中所示的通式,例如在SEQ ID NO:12中所示。在一个例子中,肽序列是Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(也称为Strep-标签®,在SEQ ID NO:7中所示)。在一个例子中,肽序列是Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:58)或最小序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称为Strep-标签® II,在SEQ ID NO:8中所示)。在一些实施方案中,所述药剂含有至少两个链霉亲和素结合肽模块的顺序排列,其中在所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3个至8个氨基酸并且含有至少序列His-Pro-Xaa (SEQ ID NO:9),其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,并且其中另一个结合模块具有相同或不同的链霉亲和素肽配体,如在SEQ ID NO:11中所示(参见例如国际公开的PCT申请号WO 02/077018;美国专利号7,981,632)。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽含有具有在SEQ ID NO:13或14中任一个中所示的式的序列。在一些实施方案中,所述药剂可以例如通过顺序排列两个链霉亲和素结合模块含有双-Strep-标签,例如可作为Twin-Strep-标签®从IBA GmbH, Göttingen, Germany商购获得,例如含有序列(SAWSHPQFEK (GGGS)<sub>2</sub>GGSAWSHPQFEK) (SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽具有在SEQ ID NO:15-19中任一个中所示的氨基酸序列。在大多数情况下,所有这些链霉亲和素结合肽结合相同的结合位点,即链霉亲和素的生物素结合位点。

[0196] 在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽由包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的试剂识别,所述试剂展现对所述肽的结合亲和力。在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白对链霉亲和素结合肽的结合亲和力的 $K_D$ 为小于 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ,但通常大于 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 。例如,如在美国专利号5,506,121中所披露的肽序列(Strep-标签)可以充当生物素模拟物并展示对链霉亲和素的结合亲和力,例如, $K_D$ 为大约在 $10^{-4} \text{M}$ 与 $10^{-5} \text{M}$ 之间。在一些情况下,可以通过在链霉亲和素分子内进行突变来进一步改善结合亲和力,参见例如美国专利号6,103,

493或国际公开的PCT申请号W02014/076277。在一些实施方案中,结合亲和力可以通过本领域已知的方法(例如下面描述的任何方法)来确定。

[0197] 在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽由如下试剂识别,所述试剂是或包含链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白)或其混合物,其中此类试剂含有用于与包含链霉亲和素结合肽的药剂可逆缔合的一个或多个结合位点Z。在一些实施方案中,所述试剂是或含有可逆地结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素的类似物或突变蛋白或抗生物素蛋白的类似物或突变蛋白。在一些实施方案中,物质(例如竞争性试剂)可以是生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽,其能够竞争与所述药剂对所述一个或多个结合位点Z的结合。在一些实施方案中,所述缀合物的所述药剂和所述物质(例如竞争性试剂)是不同的,并且与所述药剂的亲和力相比,所述物质(例如竞争性试剂)对所述一个或多个结合位点Z展现的结合亲和力更高。

[0198] 在一些实施方案中,识别所述药剂(例如链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签))的结合分子是或包含链霉亲和素,所述链霉亲和素可以是野生型链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物,如链霉亲和素样多肽。在一些实施方案中,所述结合分子是或包含抗生物素蛋白,所述抗生物素蛋白可以是野生型抗生物素蛋白或抗生物素蛋白的突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白)、具有经修饰的精氨酸的去糖基化的抗生物素蛋白(其通常展现更中性的pI并且可用作天然抗生物素蛋白的替代物)。通常,去糖基化的中性形式的抗生物素蛋白包括例如,那些可商购获得的形式,如可通过Sigma Aldrich公司获得的“Extravidin”、或可获自Thermo Scientific或Invitrogen公司的“NeutrAvidin”。

[0199] 在一些实施方案中,所述药剂(如链霉亲和素结合肽)由结合分子试剂识别,所述结合分子试剂是或包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或类似物。在一些实施方案中,野生型链霉亲和素(wt-链霉亲和素)具有由Argarana等人,Nucleic Acids Res.14(1986)1871-1882所披露的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。通常,链霉亲和素自然地作为四个相同亚基的四聚体发生,即它是同源四聚体,其中每个亚基含有针对生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的单一结合位点。链霉亲和素亚基的示例性序列是在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列,但是这样的序列还可以包括在来自其他链霉菌属(*Streptomyces*)物种的同源物中存在的序列。特别地,链霉亲和素的每个亚基可以展现对生物素的强结合亲和力,解离常数( $K_d$ )近似于约 $10^{-14}$ M。在一些情况下,链霉亲和素可以作为其中四个结合位点中仅有一个有功能的单价四聚体存在(Howarth等人(2006)Nat.Methods,3:267-73;Zhang等人(2015)Biochem.Biophys.Res.Commun.,463:1059-63)、作为其中四个结合位点中的两个有功能的二价四聚体存在(Fairhead等人(2013)J.Mol.Biol.,426:199-214),或者可以以单体或二聚体形式存在(Wu等人(2005)J.Biol.Chem.,280:23225-31;Lim等人(2010)Biochemistry,50:8682-91)。

[0200] 在一些实施方案中,链霉亲和素可以是任何形式,如野生型或未经修饰的链霉亲和素,如来自链霉菌属物种的链霉亲和素或其功能活性片段,所述功能活性片段包括含有针对所述药剂(例如链霉亲和素结合肽)和/或针对生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的结合位点的至少一个功能性亚基,例如通常含有在SEQ ID NO:1中所示的来自阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*)的野生型链霉亲和素的至少一个功能性亚基或其

功能活性片段。例如,在一些实施方案中,链霉亲和素可以包括野生型链霉亲和素的片段,所述片段在N末端和/或C末端被缩短。这种最小链霉亲和素包括在SEQ ID NO:1的氨基酸位置10至16的区域中的N末端开始并且在SEQ ID NO:1的氨基酸位置133至142的区域中的C末端终止的任何链霉亲和素。在一些实施方案中,链霉亲和素的功能活性片段含有在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,如在SEQ ID NO:2中所示的链霉亲和素可以在对应于Ala13(其编号如SEQ ID NO:1中所示)的位置处进一步含有N末端甲硫氨酸。关于链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白中残基的位置是参考在SEQ ID NO:1中残基的编号。

[0201] 在一些方面,链霉亲和素突变蛋白包括如下多肽,所述多肽与未经修饰的或野生型链霉亲和素的序列区别一个或多个氨基酸取代、缺失或添加,但包括含有针对所述药剂(例如链霉亲和素结合肽)和/或生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽的结合位点的至少一个功能性亚基。在一些方面,链霉亲和素样多肽和链霉亲和素突变蛋白可以是如下多肽,所述多肽本质上与野生型链霉亲和素是免疫学等同的,并且特别是能够以与wt-链霉亲和素相同或不同的亲和力结合生物素、生物素衍生物或生物素类似物。在一些情况下,链霉亲和素样多肽或链霉亲和素突变蛋白可以含有不是野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸,或者它们可以仅包括野生型链霉亲和素的一部分。在一些实施方案中,链霉亲和素样多肽是与野生型链霉亲和素不相同的多肽,因为宿主不具有为了将宿主产生的多肽转化为野生型链霉亲和素的结构所必需的酶。在一些实施方案中,链霉亲和素也可以作为链霉亲和素四聚体和链霉亲和素二聚体(特别是链霉亲和素同源四聚体、链霉亲和素同源二聚体、链霉亲和素异源四聚体和链霉亲和素异源二聚体)存在。通常,每个亚基通常具有针对生物素或生物素类似物或针对链霉亲和素结合肽的结合位点。链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的例子在例如WO 86/02077、DE 19641876 A1、US 6,022,951、WO 98/40396或WO 96/24606中有提及。

[0202] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可以含有不是未经修饰的或野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸,或者可以仅包括野生型或未经修饰的链霉亲和素的一部分。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有至少一个亚基,所述至少一个亚基与未经修饰的或野生型链霉亲和素的亚基相比(例如与在SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素亚基或例如在SEQ ID NO:2中所示的其功能活性片段相比)可以具有一个或多个氨基酸取代(置换)。在一些实施方案中,与野生型或未经修饰的链霉亲和素相比,链霉亲和素突变蛋白的至少一个亚基可以具有至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸差异,和/或含有包含展现与SEQ ID NO:1或2中所示的氨基酸序列至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的至少一个亚基,其中此类链霉亲和素突变蛋白展现结合所述药剂(例如链霉亲和素结合肽)和/或生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的功能活性。在一些实施方案中,氨基酸置换(取代)是保守的或非保守的突变。链霉亲和素突变蛋白的例子在本领域中是已知的,参见例如美国专利号5,168,049;5,506,121;6,022,951;6,156,493;6,165,750;6,103,493;或6,368,813;或国际公开的PCT申请号WO 2014/076277。

[0203] 在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白包括含有一个或多于一个功能性亚基(如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个,以及在一些情况下,5个、6个、

7个、8个、9个、10个、11个、12个或更多个功能性亚基)的蛋白质,所述功能性亚基含有针对生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽的一个或多个结合位点Z。在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白可以包括单体;二聚体,包括异源二聚体或同源二聚体;四聚体,包括同源四聚体、异源四聚体、单价四聚体或二价四聚体;或者可以包括更高级的多聚体或其寡聚物。

[0204] 在一些实施方案中,结合分子试剂是或含有链霉亲和素突变蛋白。在一些实施方案中,与在SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物活性部分相比,链霉亲和素突变蛋白含有一个或多个突变(例如氨基酸置换)。例如,链霉亲和素的生物活性部分可以包括在N末端和/或C末端处被缩短的链霉亲和素变体,其在一些情况下被称为最小链霉亲和素。在一些实施方案中,可以对其进行任何突变的N末端缩短的最小链霉亲和素,与在SEQ ID NO:1中所示的序列相比,在氨基酸位置10至16的区域中的N末端开始并且在氨基酸位置133至142的区域中的C末端终止。在一些实施方案中,可以对其进行任何突变的N末端缩短的链霉亲和素,含有在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,最小链霉亲和素含有从位置Ala13至Ser139的氨基酸序列,并且任选地具有N末端甲硫氨酸残基而不是Ala13。出于本文的目的,氨基酸位置的编号始终是指 SEQ ID NO:1中所示的wt-链霉亲和素的编号(例如Argarana等人,Nucleic Acids Res.14(1986),1871-1882,还参见图3)。

[0205] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白是如在美国专利号6,103,493中所描述的突变体。在一些实施方案中,基于野生型链霉亲和素的氨基酸序列(如在SEQ ID NO:1中所示的),链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44至53的区域内含有至少一个突变。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在一个或多个残基44、45、46和/或47处含有突变。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有疏水性脂肪族氨基酸(例如Val、Ala、Ile或Leu)对野生型链霉亲和素的位置44处的Glu的置换,位置45处的任何氨基酸,位置46处的脂肪族氨基酸(如疏水性脂肪族氨基酸),和/或碱性氨基酸(例如Arg或Lys,如通常Arg)对位置47处的Val的置换。在一些实施方案中,Ala处于位置46和/或Arg处于位置47和/或Val或Ile处于位置44。在一些实施方案中,链霉亲和素突变体含有残基Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>,例如在含有SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白中所示的(也称为链霉亲和素突变体1,SAM1)。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有残基Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>,例如在含有SEQ ID NO:5或6中所示的氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白中所示的(也称为SAM2)。在一些情况下,这种链霉亲和素突变蛋白描述于例如美国专利6,103,493中,并且可以在商标Strep-Tactin®下商购获得。

[0206] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白是如在国际公开的PCT申请号WO 2014/076277中所描述的突变体。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44至53的区域中含有至少两个半胱氨酸残基。在一些实施方案中,所述半胱氨酸残基存在于位置45和52,以产生连接这些氨基酸的二硫桥。在这样的实施方案中,氨基酸44通常是甘氨酸或丙氨酸,并且氨基酸46通常是丙氨酸或甘氨酸,并且氨基酸47通常是精氨酸。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸残基115至121的区域中含有至少一个突变或氨基酸差异。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有在氨基酸位置117、120和121处的至少一个突变、和/或氨基酸118和119的缺失以及至少氨基酸位置121的取代。



[0207] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在与位置117对应的位置处含有突变,所述突变可以是大的疏水性残基像Trp、Tyr或Phe,或者带电残基像Glu、Asp或Arg,或者亲水性残基像Asn或Gln,或者在一些情况下,疏水性残基Leu、Met或Ala,或者极性残基Thr、Ser或His。在一些实施方案中,位置117处的突变与以下突变组合:与位置120对应的位置处的突变(所述突变可以是突变为小的残基像Ser或Ala或Gly),以及与位置121对应的位置处的突变(所述突变可以是突变为疏水性残基,如庞大的疏水性残基像Trp、Tyr或Phe)。在一些实施方案中,在位置117处的突变与以下突变组合:与在SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物活性片段的位置120对应的位置处的突变(所述突变可以是疏水性残基如Leu、Ile、Met或Val,或通常Tyr或Phe),以及在与在SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物活性片段的位置相比的位置121对应的位置处的突变(所述突变可以是突变为小的残基像Gly、Ala或Ser,或突变为Gln,或突变为疏水性残基像Leu、Val、Ile、Trp、Tyr、Phe或Met)。在一些实施方案中,此类突变蛋白还可以含有残基Val44-Thr45-Ala46-Arg47或残基Ile44-Gly45-Ala46-Arg47。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有残基Val44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120和Tyr121。在一些实施方案中,突变蛋白链霉亲和素含有在SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列或展现与在SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,含有残基Val44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120和Tyr121,并且展现结合生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽的功能活性。

[0208] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可以含有以任何组合的任何上述突变,并且所得的链霉亲和素突变蛋白可以展现 $K_D$ 为小于 $2.7 \times 10^{-4}M$ 的对链霉亲和素结合肽(如包含氨基酸Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly的一种链霉亲和素结合肽;也称为Strep-标签®(在SEQ ID NO:7中所示))的结合亲和力,和/或 $K_D$ 为小于 $1.4 \times 10^{-4}M$ 的对链霉亲和素结合肽(如包含氨基酸Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys的一种链霉亲和素结合肽;也称为Strep-标签®II(在SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:58中所示))的结合亲和力,和/或 $K_D$ 为小于 $1 \times 10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $1 \times 10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $1 \times 10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 或 $1 \times 10^{-7}M$ ,但通常大于 $1 \times 10^{-13}M$ 、 $1 \times 10^{-12}M$ 或 $1 \times 10^{-11}M$ 的对在SEQ ID NO:7-19或58中任一个中所示的链霉亲和素结合肽中任一个的结合亲和力。

[0209] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白展现在SEQ ID NO:3-6、27或28中任一个中所示的氨基酸序列,或与在SEQ ID NO:3-6、27或28中任一个中所示的氨基酸序列展现至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,并且展现 $K_D$ 为小于 $2.7 \times 10^{-4}M$ 的对链霉亲和素结合肽(如包含氨基酸Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly的一种链霉亲和素结合肽;也称为Strep-标签®(在SEQ ID NO:7中所示))的结合亲和力,和/或 $K_D$ 为小于 $1.4 \times 10^{-4}M$ 的对链霉亲和素结合肽(如包含氨基酸Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys的一种链霉亲和素结合肽;也称为Strep-标签®II(在SEQ ID NO:8或58中所示))的结合亲和力,和/或 $K_D$ 为小于 $1 \times 10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $1 \times 10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $1 \times 10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 或 $1 \times 10^{-7}M$ ,但通常大于 $1 \times 10^{-13}M$ 、 $1 \times 10^{-12}M$ 或 $1 \times 10^{-11}M$ 的对在SEQ ID NO:7-19或58中任一个中所示的肽配体中任一个的结合亲和力。



[0210] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白还展现与其他链霉亲和素配体(例如但不限于生物素、亚氨基生物素、硫辛酸、脱硫生物素、二氨基生物素、HABA(羟基偶氮苯-苯甲酸)和/或二甲基-HABA)的结合。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白展现对另一种链霉亲和素配体(如生物素或脱硫生物素)的结合亲和力,所述结合亲和力大于所述链霉亲和素突变蛋白对链霉亲和素肽配体(如在SEQ ID NO:7-19或58中任一个中所示的)的结合亲和力。因此,在一些实施方案中,生物素或生物素类似物或衍生物(例如脱硫生物素)可以用作所提供的方法中的竞争试剂。例如,作为例子,命名为Strep-tactin<sup>®</sup>的突变蛋白链霉亲和素(例如含有在SEQ ID NO:4中所示的序列)与命名为Strep-标签<sup>®</sup> II的链霉亲和素肽(例如含有在SEQ ID NO:8或58中所示的氨基酸)的相互作用由K<sub>d</sub>为大约10<sup>-6</sup>M的结合亲和力表征,相比之下对于生物素-链霉亲和素相互作用的K<sub>d</sub>为大约10<sup>-13</sup>M。在一些情况下,能够以K<sub>d</sub>在或在约10<sup>-10</sup>与10<sup>-13</sup>M之间的高亲和力结合Strep-tactin<sup>®</sup>的生物素可以与Strep-标签<sup>®</sup> II竞争结合位点。

[0211] 在一些实施方案中,结合分子是如下试剂,所述试剂是一种或多种链霉亲和素或抗生物素蛋白、或链霉亲和素的任何类似物或突变蛋白、或抗生物素蛋白的类似物或突变蛋白(例如中性抗生物素蛋白)的寡聚物或聚合物。在一些实施方案中,所述寡聚物由相同链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的多个单个分子(例如多个同源四聚体)生成或产生,在这种情况下,所述寡聚物的每个结合位点Z(例如Z1)是相同的。

[0212] 在一些实施方案中,结合分子试剂是一种或多种链霉亲和素或抗生物素蛋白、或链霉亲和素的任何类似物或突变蛋白、或抗生物素蛋白的类似物或突变蛋白(例如中性抗生物素蛋白)的寡聚物或聚合物。在一些实施方案中,所述寡聚物由相同链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的多个单个分子(例如多个同源四聚体)生成或产生,在这种情况下,所述寡聚物的每个结合位点Z(例如Z1)是相同的。例如,在一些情况下,寡聚物可以含有多个结合位点Z1,如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、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、31个、32个、33个、34个、35个、40个、45个、50个或更多个结合位点Z1。在一些实施方案中,寡聚物生成或产生自多个单个分子,所述多个单个分子可以是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的异源四聚体,和/或生成或产生自多个的两个或更多个不同的单个分子(例如,链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的不同的同源四聚体),所述两个或更多个不同的单个分子在它们的结合位点Z(例如Z1和Z2)方面不同,在这种情况下多个不同的结合位点Z(例如Z1和Z2)可以存在于所述寡聚物中。例如,在一些情况下,寡聚物可以含有多个结合位点Z1和多个结合位点Z2,其组合可以包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、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、31个、32个、33个、34个、35个、40个、45个、50个或更多个组合的结合位点Z1和Z2。

[0213] 在一些情况下,相应的寡聚物或聚合物可以通过多糖交联。在一个实施方案中,链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的类似物(例如中性抗生物素蛋

白)的寡聚物或聚合物可以通过如下来制备:在第一步骤中将羧基残基引入多糖(例如葡聚糖)中,基本上如在Noguchi,A等人Bioconjugate Chemistry (1992) 3,132-137中所描述的。在一些此类方面,然后可以在第二步骤中使用常规碳二亚胺化学将链霉亲和素或抗生物素蛋白或其类似物经由内部赖氨酸残基的伯氨基基团和/或游离N末端与葡聚糖骨架中的羧基基团连接。在一些情况下,链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何类似物的交联寡聚物或聚合物还可以通过经由双功能分子(用作接头)如戊二醛交联或者通过本领域中描述的其他方法获得。

[0214] 在一些实施方案中,寡聚物或聚合物通过使用双功能接头或其他化学接头(如戊二醛)交联单个分子或构成单个分子的亚基的复合物或者通过本领域已知的其他方法获得。在一些方面,链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何突变蛋白或类似物的交联寡聚物或聚合物可以通过经由双功能分子(用作接头)如戊二醛交联单个链霉亲和素或抗生物素蛋白分子或通过本领域中描述的其他方法获得。例如,有可能通过将硫醇基团引入链霉亲和素突变蛋白(例如,这可以通过使链霉亲和素突变蛋白与2-亚氨基硫杂环戊烷(Trauts试剂)反应并且通过例如在单独的反应中激活在链霉亲和素突变蛋白中可用的氨基基团来进行)来生成链霉亲和素突变蛋白的寡聚物。在一些实施方案中,氨基基团的这种激活可以通过使链霉亲和素突变蛋白与可商购获得的异双功能交联剂(如磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基SMCC)或琥珀酰亚胺基-6-( $\beta$ -马来酰亚胺丙酰胺基)己酸酯(SMPH))的反应来实现。在一些此类实施方案中,将如此获得的两种反应产物混合在一起,通常导致在一批经修饰的链霉亲和素突变蛋白中包含的硫醇基团与另一批经修饰的链霉亲和素突变蛋白的激活的(如通过马来酰亚胺官能团)氨基酸反应。在一些情况下,通过这一反应,形成链霉亲和素突变蛋白的多聚体/寡聚物。这些寡聚物可以具有任何合适数量的单个分子,如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、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、31个、32个、33个、34个、35个、40个、45个、50个或更多个,并且寡聚化程度可以根据反应条件而改变。

[0215] 在一些实施方案中,可以经由尺寸排阻色谱法分离寡聚物或聚合物试剂,并且可以使用任何所希望的级分作为结合分子试剂。例如,在一些实施方案中,在2-亚氨基硫杂环戊烷和异双功能交联剂(如磺基SMCC)的存在下,使经修饰的链霉亲和素突变蛋白反应之后,可以经由尺寸排阻色谱法分离寡聚物或聚合物试剂,并且可以使用任何所希望的级分作为所述试剂。在一些实施方案中,寡聚物不具有(并且不需要具有)单一分子量,但是它们可以观察到统计权重分布,如高斯分布。在一些情况下,可以将具有多于三个链霉亲和素或突变蛋白四聚体(例如同源四聚体或异源四聚体)的任何寡聚物用作可溶性试剂,例如通常3个至50个四聚体(例如同源四聚体或异源四聚体)、10个至40个四聚体(例如,同源四聚体或异源四聚体)、或25个至35个四聚体(例如同源四聚体或异源四聚体)。寡聚物可以具有例如从3个至25个链霉亲和素突变蛋白四聚体,例如同源四聚体或异源四聚体。在一些方面,在链霉亲和素突变蛋白的分子量为约50kDa的情况下,可溶性寡聚物可以具有如下的分子量:从约150kDa至约2000kDa、约150kDa至约1500kDa、约150kDa至约1250kDa、约150kDa至1000kDa、约150kDa至约500kDa或约150kDa至约300kDa、约300kDa至约2000kDa、约300kDa至约1500kDa、约300kDa至约1250kDa、约300kDa至1000kDa、约300kDa至约500kDa、约500kDa至

约2000kDa、约500kDa至约1500kDa、约500kDa至约1250kDa、约500kDa至1000kDa、约1000kDa至约2000kDa、约1000kDa至约1500kDa、约1000kDa至约1250kDa、约1250kDa至约2000kDa或约1500kDa至约2000kDa。通常,因为每个链霉亲和素分子/突变蛋白具有四个生物素结合位点,所以这样的试剂可以提供12个至160个结合位点Z,如12个至100个结合位点Z。

[0216] 在一些实施方案中,结合分子试剂,如任何描述的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白(例如Strep-Tactin<sup>®</sup>)试剂,可以用一种或多种可检测标记进行标记。在一些实施方案中,将所述试剂用荧光标记进行标记。示例性标记的Strep-Tactin<sup>®</sup>试剂是已知的,或可商购获得,包括例如Strep-Tactin-HRP、Strep-Tactin AP、Strep-Tactin Chromeo 488、Strep-Tactin Chromeo 546、或Strep-Tactin Oyster 645,每种都可获自IBA (Goettingen Germany)。

[0217] 在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签,如Strep-标签<sup>®</sup> II或双-Strep-标签)可以由抗体或抗原结合片段识别。在一些实施方案中,所述抗体含有可以特异性结合细胞表面缀合物的药剂的表位或区域的至少一个结合位点。针对此类链霉亲和素结合肽的抗体是已知的,包括针对例如存在于Strep-标签<sup>®</sup> II或双-Strep-标签中的肽序列SAWSHPQFEK (SEQ ID NO:58) 或最小序列WSHPQFEK (SEQ ID NO:8) 的抗体 (Schmidt T. 和Skerra A., Nature protocols, 2007; 国际专利申请公开号W02015067768)。在一些实施方案中,可以使用例如可商购获得的StrepMAB-Classic (IBA, Goettingen Germany)、StrepMAB-lmmo (IBA)、抗Strep标签II抗体 (Genscript)、或Strep-标签抗体 (Qiagen) 来检测链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签,如Strep-标签<sup>®</sup> II或双-Strep-标签)。在一些实施方案中,将所述抗体或结合配偶体用一种或多种可检测标记进行标记,以促进工程化细胞的纯化、选择和/或检测。例如,分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。

[0218] C. 示例性缀合物

[0219] 在一些实施方案中,缀合物含有经修饰的EGFR和能够结合链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的至少一种药剂(例如亲和标签)。在一些实施方案中,经修饰的EGFR是如上所述的任何一种,如在SEQ ID NO:46中所示的EGFRt。在一些实施方案中,缀合物含有经修饰的HER2和能够结合链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的至少一种药剂(例如亲和标签)。在一些实施方案中,经修饰的HER2/neu/ErbB2是如上所述的任何一种,如在SEQ ID NO:92中所示的HER2t。在一些此类实施方案中,所述药剂是链霉亲和素结合肽,如Strep-标签<sup>®</sup>、Strep-标签<sup>®</sup> II或双-Strep-标签,包括上面描述的和在SEQ ID NO:7、8、15-19或58中所示的任何一种。

[0220] 在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽与细胞表面分子的N末端部分融合。在一些实施方案中,所提供的细胞表面缀合物包含如下氨基酸序列,所述氨基酸序列含有其中从N末端至C末端顺序包含以下的氨基酸残基:链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签<sup>®</sup>、Strep-标签<sup>®</sup> II或双-Strep-标签,如在SEQ ID NO:7、8、15-19或58中任一个中所示的)和经修饰的EGFR(例如EGFRt,如在SEQ ID NO:46中所示的)。在一些情形中,链霉亲和素结合肽直接与经修饰的EGFR融合。在一些情形中,链霉亲和素结合肽间接与经修饰的EGFR融合或连接,例如经由如所描述的至少一个多肽接头(例如,在SEQ ID NO:55、56、59-62、98或99中任一

个中所示的)。例如,在一些方面,链霉亲和素结合肽与附着于经修饰的EGFR上的第一多肽接头连接。在一些方面,含有EGFRt和链霉亲和素结合肽的细胞表面缀合物是融合蛋白。

[0221] 在一些实施方案中,所提供的细胞表面缀合物包含如下氨基酸序列,所述氨基酸序列含有其中从N末端至C末端顺序包含以下的氨基酸残基:链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签®、Strep-标签® II或双-Strep-标签,如在SEQ ID NO:7、8、15-19或58中任一个中所示的)和经修饰的HER2/neu/ErbB2(例如HER2t,如在SEQ ID NO:92中所示的)。在一些情形中,链霉亲和素结合肽直接与经修饰的HER2/neu/ErbB2融合。在一些情形中,链霉亲和素结合肽间接与经修饰的EGFR融合或连接,例如经由如所描述的至少一个多肽接头(例如,在SEQ ID NO:55、56、59-62、98或99中任一个中所示的)。例如,在一些方面,链霉亲和素结合肽与附着于经修饰的HER2/neu/ErbB2上的第一多肽接头连接。在一些方面,含有HER2t和链霉亲和素结合肽的细胞表面缀合物是融合蛋白。

[0222] 在一些实施方案中,所述缀合物按N末端至C末端顺序包含:(1)至少一种药剂(例如Strep-标签®),所述至少一种药剂具有在SEQ ID NO:8、15-19或58中任一个中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8、15-19或58中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;(2)任选地,至少一个肽接头,如在SEQ ID NO:55、56、59-62、98或99中所示的肽接头;以及(3)经修饰的EGFR,所述经修饰的EGFR具有在SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:46至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。

[0223] 在一些实施方案中,所述缀合物按N末端至C末端顺序包含:(1)至少一种药剂(例如Strep-标签®),所述至少一种药剂具有在SEQ ID NO:8、15-19或58中任一个中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8、15-19或58中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;(2)任选地,至少一个肽接头,如在SEQ ID NO:55、56、59-62、98或99中所示的肽接头;以及(3)经修饰的HER2/neu/ErbB2,所述经修饰的HER2/neu/ErbB2具有在SEQ ID NO:92中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:92至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。

[0224] 在一些实施方案中,所述缀合物含有PSMA或其修饰形式(例如经修饰的PSMA)、和能够结合链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的至少一种药剂(例如亲和和标签)。在一些实施方案中,经修饰的PSMA是如上所述的任何一种(如在SEQ ID NO:95中所示的)、或SEQ ID NO:94的N末端截短。在一些此类实施方案中,所述药剂是链霉亲和素结合肽,如Strep-标签®、Strep-标签® II或双-Strep-标签,包括上面描述的和在SEQ ID NO:7、8、15-19或58中所示的任何一种。

[0225] 在一些实施方案中,所述缀合物按N末端至C末端顺序包含:(1)PSMA或经修饰的PSMA,所述PSMA或经修饰的PSMA具有在SEQ ID NO:94或95中任一个中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:94或95中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;(2)任选地,至少一个肽接头,如在SEQ ID NO:55、56、59-62、98或99中所示的肽接头;以及(3)至少一种药剂(例如

Strep-标签®),所述至少一种药剂具有在SEQ ID NO:8、15-19或58中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8、15-19或58至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。

[0226] 在一些实施方案中,细胞表面缀合物蛋白质在其N末端进一步含有用于将所表达的缀合物靶向分泌途径以作为表面或膜蛋白插入膜中的信号肽。在一些实施方案中,所述信号肽是细胞表面分子的天然信号肽,例如,包含在SEQ ID NO:64中的EGFR。在一些实施方案中,所述信号肽是非天然或异源的信号肽。在一些实施方案中,所述信号肽源自粒细胞巨噬细胞集落刺激因子受体(GMCSFR) $\alpha$ 链,其具有在SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列,例如由在SEQ ID NO:47中所示的序列或其具有简并密码子的序列编码。

[0227] III.工程化细胞

[0228] 本文提供了表达所提供的细胞表面缀合物中任何一种的工程化细胞。在一些实施方案中,工程化细胞共表达细胞表面缀合物和一种或多种重组抗原受体。在一些实施方案中,所述细胞可以包括用重组受体(例如嵌合抗原受体)基因工程化的细胞。

[0229] A.重组抗原受体

[0230] 提供了表达重组受体的工程化细胞(如T细胞),所述重组受体包括含有配体结合结构域或其结合片段的嵌合受体(如功能性非TCR抗原受体、如嵌合抗原受体(CAR)),并且还包括T细胞受体(TCR)(如转基因TCR)及其组分。嵌合受体(如CAR)通常包括(在一些方面经由接头和/或一个或多个跨膜结构域)与一种或多种细胞内信号传导组分连接的细胞外抗原(或配体)结合结构域。

[0231] 1.嵌合抗原受体

[0232] 在一些实施方案中,提供了工程化细胞(如T细胞),其表达对特定抗原(或标记或配体)具有特异性的CAR,所述特定抗原例如为在特定细胞类型的表面上表达的抗原。在一些实施方案中,所述抗原是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,抗原在疾病或病症的细胞例如肿瘤细胞或致病细胞上选择性表达或过表达。在其他实施方案中,抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0233] 在特定实施方案中,重组受体(如嵌合受体)含有细胞内信号传导结构域或区域,所述细胞内信号传导结构域或区域包括激活的或刺激的细胞质信号传导结构域或区域(也可互换地称为激活的或刺激的细胞内信号传导结构域或区域),例如能够在T细胞中诱导初级激活信号的激活的或刺激的细胞质(细胞内)结构域或区域,例如,T细胞受体(TCR)组分的细胞质信号传导结构域或区域(例如,CD3-zeta(CD3 $\zeta$ )链或其功能变体或信号传导部分的 $\zeta$ 链的细胞质信号传导结构域或区域);和/或所述细胞内信号传导区域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。

[0234] 在一些实施方案中,嵌合受体还含有特异性地结合至配体(例如抗原)抗原的细胞外配体结合结构域。在一些实施方案中,嵌合受体是CAR,其含有特异性地结合至抗原的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中,配体(如抗原)是在细胞表面上表达的蛋白质。在一些实施方案中,CAR是TCR样CAR,并且抗原是加工过的肽抗原,如细胞内蛋白的肽抗原,其与TCR一样在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下在细胞表面上被识别。

[0235] 示例性抗原受体(包括CAR)以及将这种受体工程化并引入细胞中的方法包括例如

国际专利申请公开号WO 200014257、WO 2013126726、WO 2012/129514、WO 2014031687、WO 2013/166321、WO 2013/071154、WO 2013/123061、美国专利申请公开号US 2002131960、US 2013287748、US 20130149337、美国专利号:6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118以及欧洲专利申请号EP2537416中描述的那些抗原受体,和/或Sadelain等人,Cancer Discov.2013年4月;3(4):388-398;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338;Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,2012年10月;24(5):633-39;Wu等人,Cancer,2012年3月18(2):160-75描述的那些抗原受体。在一些方面,抗原受体包括如美国专利号7,446,190中描述的CAR,以及国际专利申请公开号WO/2014055668 A1中描述的那些。CAR的实例包括如在任何上述出版物中披露的CAR,所述出版物例如WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282;Kochenderfer等人,2013,Nature Reviews Clinical Oncology,10,267-276(2013);Wang等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701;以及Brentjens等人,Sci Transl Med.2013 5(177)。还参见WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号:7,446,190和美国专利号:8,389,282。

[0236] 在一些实施方案中,CAR被构建为具有对特定抗原(或标记或配体)的特异性,所述特定抗原例如为在过继疗法靶向的特定细胞类型中表达的抗原(例如癌症标记)和/或旨在诱导衰减应答的抗原(例如在正常或未患病细胞类型上表达的抗原)。因此,CAR通常在其细胞外部分中包括一种或多种抗原结合分子,例如一种或多种抗原结合片段、结构域或部分,或一种或多种抗体可变结构域,和/或抗体分子。在一些实施方案中,所述CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,如源自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0237] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分作为重组受体(例如抗原受体)的部分在细胞上表达。所述抗原受体包括功能性非TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。通常,含有针对肽-MHC复合物展现TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。在一些实施方案中,在一些方面,对TCR样CAR的MHC-肽复合物具有特异性的细胞外抗原结合结构域通过接头和/或一个或多个跨膜结构域与一个或多个细胞内信号传导组分连接。在一些实施方案中,此类分子通常可以通过天然抗原受体(如TCR)模拟或接近信号,并且任选地通过这种受体与共刺激受体组合模拟或接近信号。

[0238] 在一些实施方案中,重组受体(例如嵌合受体,例如CAR)包括与抗原(或配体)结合(例如特异性结合)的配体结合结构域。嵌合受体靶向的抗原包括在通过过继细胞疗法靶向的疾病、病症或细胞类型的情况下表达的抗原。所述疾病和病症包括增殖性、肿瘤性和恶性疾病和障碍,包括癌症和肿瘤,包括血液癌、免疫系统癌症,如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤,如B型白血病、T型白血病和骨髓性白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0239] 在一些实施方案中,所述抗原(或配体)是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,如与正常或非靶向细胞或组织相比,抗原(或配体)在疾病或病症的细胞(例如肿瘤或致病细胞)上选择性表达或过表达。在其他实施方案中,抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0240] 在一些实施方案中,CAR含有抗体或抗原结合片段(例如scFv),其特异性识别在细

胞表面上表达的抗原(如完整抗原)。

[0241] 在一些实施方案中,所述抗原(或配体)是肿瘤抗原或癌症标记。在一些实施方案中,所述抗原(或配体)是或包括 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素( $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CC基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、III型表皮生长因子受体突变(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 $\alpha$ 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 $\alpha$ (IL-22Ra)、IL-13受体 $\alpha 2$ (IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 $\kappa$ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、天然杀伤组2成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Wilms肿瘤1(WT-1)、病原体特异性抗原或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中,所述抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig $\kappa$ 、Ig $\lambda$ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0242] 在一些实施方案中,所述抗原(或配体)是肿瘤抗原或癌症标记。在一些实施方案中,所述抗原(或配体)是或包括孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、BCMA、间皮素、CEA、和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha 2$ 、kdr、 $\kappa$ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原(oncofetal antigen)、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、和MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白(如细胞周期蛋白A1(CCN1))、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中,受体靶向的抗原是CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig $\kappa$ 、Ig $\lambda$ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0243] 在一些实施方案中,所述抗原是病原体特异性抗原或病原体表达的抗原。在一些实施方案中,抗原是病毒抗原(例如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生

虫抗原。

[0244] 在一些实施方案中, CAR含有TCR样抗体, 例如抗体或抗原结合片段(例如scFv), 其特异性识别作为MHC-肽复合物存在于细胞表面上的细胞内抗原(例如肿瘤相关抗原)。在一些实施方案中, 识别MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分可以作为重组受体的部分(例如抗原受体)在细胞上表达。所述抗原受体包括功能性非TCR抗原受体, 如嵌合抗原受体(CAR)。通常, 含有针对肽-MHC复合物展现TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。

[0245] 提及“主要组织相容性复合物”(MHC)是指含有多态性肽结合位点或结合沟的蛋白质, 通常是糖蛋白, 在一些情况下, 所述蛋白质可以与多肽的肽抗原(包括由细胞机构处理的肽抗原)复合。在一些情况下, MHC分子可以在细胞表面上展示或表达, 包括作为与肽的复合物, 即MHC-肽复合物, 用于呈现具有T细胞上的抗原受体(例如TCR或TCR样抗体)可识别的构象的抗原。通常, MHC I类分子是异二聚体, 其具有跨越 $\alpha$ 链的膜, 在一些情况下具有三个 $\alpha$ 结构域和非共价缔合的 $\beta$ 2微球蛋白。通常, MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 $\alpha$ 和 $\beta$ 组成, 两者通常都跨越膜。MHC分子可以包括MHC的有效部分, 其含有抗原结合位点或用于结合肽的位点以及由适当抗原受体识别所需的序列。在一些实施方案中, MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面, 其中MHC-肽复合物由T细胞(例如通常CD8<sup>+</sup>T细胞, 但在一些情况下是CD4<sup>+</sup>T细胞)识别。在一些实施方案中, MHC II类分子将源自囊泡系统的肽递送至细胞表面, 其中所述肽通常由CD4<sup>+</sup>T细胞识别。通常, MHC分子由一组连锁基因座编码, 其在小鼠中统称为H-2并且在人中统称为人白细胞抗原(HLA)。因此, 通常人MHC也以可称为人白细胞抗原(HLA)。

[0246] 术语“MHC-肽复合物”或“肽-MHC复合物”或其变体是指肽抗原与MHC分子的复合物或缔合物, 例如通常通过所述肽在MHC分子的结合沟或裂缝中的非共价相互作用来形成。在一些实施方案中, MHC-肽复合物存在或展示于细胞表面上。在一些实施方案中, MHC-肽复合物可由抗原受体(例如TCR、TCR样CAR或其抗原结合部分)特异性地识别。

[0247] 在一些实施方案中, 多肽的肽(例如肽抗原或表位)可以与MHC分子缔合, 例如用于由抗原受体识别。通常, 所述肽源自或基于较长生物分子(例如多肽或蛋白质)的片段。在一些实施方案中, 所述肽的长度通常为约8至约24个氨基酸。在一些实施方案中, 肽的长度为或为约9至22个氨基酸, 用于在MHC II类复合物中识别。在一些实施方案中, 肽的长度为或为约8至13个氨基酸, 用于在MHC I类复合物中识别。在一些实施方案中, 在识别MHC分子(例如MHC-肽复合物)背景中的肽后, 抗原受体(例如TCR或TCR样CAR)产生或触发激活信号至T细胞, 诱导T细胞应答, 如T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性T细胞应答或其他应答。

[0248] 在一些实施方案中, TCR样抗体或抗原结合部分是已知的或者可以通过在本领域中已知方法产生(参见例如美国公开申请号US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US 20090226474; US 20090304679; 和国际PCT公开号WO 03/068201)。

[0249] 在一些实施方案中, 特异性地结合至MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分可以通过用有效量的含有特定MHC-肽复合物的免疫原对宿主进行免疫来产生。在一些情况下, MHC-肽复合物的肽是能够结合至MHC的抗原的表位, 例如肿瘤抗原, 例如通用肿瘤抗原、骨髓瘤抗原或如下文所述的其他抗原。在一些实施方案中, 然后向宿主给予有效量的免疫原



以用于引发免疫应答,其中所述免疫原保持其三维形式持续一段足以引发针对所述肽在所述MHC分子的结合沟中的三维呈递的免疫应答的时间。然后测定从宿主收集的血清以确定是否产生了识别MHC分子结合沟中的肽的三维呈现的所需抗体。在一些实施方案中,可以评估所产生的抗体以确认所述抗体可以区分MHC-肽复合物与单独的MHC分子、单独的目标肽以及MHC与无关肽的复合物。然后可以分离所希望的抗体。

[0250] 在一些实施方案中,特异性地结合至MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分可以通过采用抗体文库展示方法(例如噬菌体抗体文库)来产生。在一些实施方案中,可以产生突变型Fab、scFv或其他抗体形式的噬菌体展示文库,例如其中所述文库的成员在一个或多个CDR的一个或多个残基处被突变。此类方法的示例在本领域是已知的(参见例如美国公开的申请号US 20020150914、US 2014/0294841;和Cohen CJ.等人(2003) *J Mol. Recogn.* 16: 324-332)。

[0251] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V<sub>H</sub>)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))以及单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化的和/或以其他方式修饰的形式,如胞内抗体、肽体(peptibody)、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体(heteroconjugate antibody)、多特异性(例如,双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。

[0252] 在一些实施方案中,抗原结合蛋白、抗体及其抗原结合片段特异性地识别全长抗体的抗原。在一些实施方案中,抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中,所述抗体重链恒定区选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更特别是IgG1(例如,人IgG1)。在另一个实施方案中,抗体轻链恒定区选自例如κ或λ,特别是κ。

[0253] 所提供的抗体包括抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>;双抗体;线性抗体;可变重链(V<sub>H</sub>)区;单链抗体分子,如scFv和单结构域V<sub>H</sub>单抗体;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,所述抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0254] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域可以足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域分离结合所述特定抗原的抗体,以分别筛选互补的V<sub>L</sub>或V<sub>H</sub>结构域的文库。参见例如,Portolano等人,*J. Immunol.* 150:880-887 (1993);Clarkson等人,*Nature* 352:624-628 (1991)。

[0255] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可

变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。在一些实施方案中,CAR包含特异性地结合抗原的抗体重链结构域,所述抗原例如癌症标记或待靶向的细胞或疾病(例如肿瘤细胞或癌细胞)的细胞表面抗原,例如本文描述的或在本领域中已知的任何靶抗原。

[0256] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,所述抗体是重组产生的片段,如包含天然不存在的排列的片段(如具有通过合成接头(例如,肽接头)连接的两个或更多个抗体区或链的那些),和/或可不通过酶消化天然存在的完整抗体产生的片段。在一些实施方案中,抗体片段是scFv。

[0257] “人源化”抗体是这样的抗体,其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基源自非人CDR并且所有或基本上所有FR氨基酸残基源自人FR。人源化抗体任选地可以包括衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指所述非人抗体的变体,其经历人源化以通常降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生出CDR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0258] 因此,在一些实施方案中,嵌合抗原受体(包括TCR样CAR)包括含有抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些实施方案中,所述抗体或片段包括scFv。在一些方面,嵌合抗原受体包括含有抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导结构域。

[0259] 在一些实施方案中,重组受体(如CAR,如其抗体部分)进一步包括间隔子,所述间隔子可以是或包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分或其变体或经修饰形式,如铰链区(例如,IgG4铰链区)和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的。在一些方面,所述恒定区的部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区。与不存在间隔子的情况下相比,间隔子的长度可以提供抗原结合后增强的细胞反应性。在一些例子中,所述间隔子的长度为或约12个氨基酸或者长度不超过12个氨基酸。示例性间隔子包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸,约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸(并且包括任何列出的范围的端点之间的任何整数)的那些。在一些实施方案中,间隔子区具有约12个或更少的氨基酸、约119个或更少的氨基酸或约229个或更少的氨基酸。示例性间隔子包括单独的IgG4铰链、与CH2和CH3结构域连接的IgG4铰链或与CH3结构域连接的IgG4铰链。示例性间隔子包括但不限于在Hudecek等人(2013) Clin. Cancer Res., 19:3153,或国际专利申请公开号WO 2014031687中描述的那些。在一些实施方案中,所述间隔子具有SEQ ID NO:70中所示的序列,并且由SEQ ID NO:71中所示的序列编码。在一些实施方案中,所述间隔子具有SEQ ID NO:72中列出的序列。在一些实施方案中,所述间隔子具有SEQ ID NO:73中列出的序列。

[0260] 在一些实施方案中,所述恒定区或部分是人IgD的。在一些实施方案中,所述间隔子具有SEQ ID NO:74中列出的序列。在一些实施方案中,间隔子具有展现与SEQ ID NO:70、72、73和74中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0261] 所述抗原识别结构域通常与一种或多种细胞内信号传导组分(如通过抗原受体复合物(如TCR复合物)(在CAR的情况下)模拟激活和/或经由另一种细胞表面受体模拟信号的信号传导组分)连接。因此,在一些实施方案中,抗原结合组分(例如,抗体)与一个或多个跨膜和细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方案中,所述跨膜结构域与细胞外结构域融合。在一个实施方案中,使用天然与所述受体(例如,CAR)中的一个结构域缔合的跨膜结构域。在一些情形中,通过氨基酸取代选择或修饰所述跨膜结构域以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与所述受体复合物的其他成员的相互作用。

[0262] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域源自天然或合成来源。当来源是天然的时,在一些方面,所述结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括源自以下项的那些跨膜区(即,包括以下项的至少一个或多个跨膜区):T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ , CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154。可替代地,在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成跨膜结构域主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,连接是通过接头、间隔子和/或一个或多个跨膜结构域。

[0263] 细胞内信号传导结构域包括通过天然抗原受体模拟或接近信号、通过这种受体与共刺激受体组合模拟或接近信号和/或仅通过共刺激受体模拟或接近信号的那些。在一些实施方案中,存在短的寡肽或多肽接头例如长度为2至10个氨基酸的接头(如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体),并在CAR的跨膜结构域与细胞质信号传导结构域之间形成连接。

[0264] 受体例如CAR通常包括至少一种细胞内信号传导组分或多种细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,受体包括TCR复合物的细胞内组分,如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3链例如CD3 $\zeta$ 链。因此,在一些方面,所述ROR1结合抗体与一个或多个细胞信号传导模块连接。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方案中,受体(例如CAR)进一步包括一种或多种另外的分子(如Fc受体 $\gamma$ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面,所述CAR包括在CD3-zeta(CD3- $\zeta$ )或Fc受体 $\gamma$ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0265] 在一些实施方案中,在连接所述CAR后,所述CAR的胞质结构域或细胞内信号传导结构域激活免疫细胞(例如,工程化以表达所述CAR的T细胞)的正常效应子功能或应答中的至少一种。例如,在一些情境下,CAR诱导T细胞的功能,如细胞溶解活性或T辅助活性,如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中,使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导结构域的截短部分(例如,如果其转导效应子功能信号的话)代替完整的免疫刺激链。在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导结构域包括T细胞受体(TCR)的胞质序列,并且在一些方面还包括共受体(其在天然背景下与这种受体并行起作用以在抗原受体接合后启动信号转导)和/或此类分子的任何衍生物或变体的那些,和/或具有相同功能能力的任何合成序列。

[0266] 在天然TCR的背景下,完全激活通常不仅需要通过TCR进行信号传导,还需要共刺激信号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全激活,用于生成次级或共刺激信号的组分

也被包括在所述CAR中。在其他实施方案中,所述CAR不包括用于生成共刺激信号的组分。在一些方面,另外的CAR在同一细胞中表达,并且提供用于生成次级或共刺激信号的组分。

[0267] 在一些方面,将T细胞激活描述为由两个类别的细胞质信号传导序列来介导:通过TCR启动抗原依赖性初级激活的那些序列(初级细胞质信号传导序列)以及以非抗原依赖性方式作用以提供刺激或共刺激信号的那些序列(次级细胞质信号传导序列)。在一些方面,CAR包括此类信号传导组分中的一种或两种。

[0268] 在一些方面,所述CAR包括调节所述TCR复合物的初级激活的初级胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列可以含有信号传导基序(其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM)。含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的例子包括源自TCR或CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 或FcR $\beta$ 的那些。在一些实施方案中,所述CAR中的胞质信号传导分子含有源自CD3 $\zeta$ 的胞质信号传导结构域、其部分或序列。

[0269] 在一些实施方案中,所述CAR包括共刺激受体(如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS)的信号传导结构域和/或跨膜部分。在一些方面,同一CAR同时包括激活和共刺激组分。

[0270] 在一些实施方案中,激活结构域包括于一个CAR内,然而共刺激组分是由识别另一种抗原的另一种CAR提供。在一些实施方案中,所述CAR包括在同一细胞上表达的激活或刺激CAR和共刺激CAR(参见WO 2014/055668)。

[0271] 在某些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含连接至CD3(例如,CD3- $\zeta$ )细胞内结构域的CD28跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含连接至CD3 $\zeta$ 细胞内结构域的嵌合CD28和CD137(4-1BB,TNFRSF9)共刺激结构域。

[0272] 在一些实施方案中,CAR在细胞质部分中包含一个或多个,例如两个或更多个共刺激结构域和激活结构域,例如主激活结构域。示例性CAR包括CD3- $\zeta$ 、CD28和4-1BB的细胞内组分。

[0273] 在一些情况下,CAR被称为第一代、第二代和/或第三代CAR。在一些方面,第一代CAR是在抗原结合后仅提供CD3链诱导的信号信号的CAR;在一些方面,第二代CAR是提供这种信号和共刺激信号的CAR,例如包括来自共刺激受体(如CD28或CD137)的细胞内信号传导结构域的CAR;在一些方面,第三代CAR在一些方面包含不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0274] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括含有本文描述的抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些方面,嵌合抗原受体包括含有本文描述的抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述抗体或片段包括scFv或单一结构域V<sub>H</sub>抗体,并且细胞内结构域含有ITAM。在一些方面,细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta(CD3 $\zeta$ )链的 $\zeta$ 链的信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括连接细胞外结构域和细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[0275] 在一些方面,跨膜结构域含有CD28的跨膜部分。可以直接或间接地连接细胞外结构域和跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域和跨膜结构域通过间隔子(如本文描述的任何间隔子)连接。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域,如在跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些方面,所述T细胞共刺激分子是CD28或41BB。

[0276] 在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如抗体片段)、是或含有CD28或其功能变体的

跨膜部分的跨膜结构域,以及含有CD28或其功能变体的信号传导部分和CD3 $\zeta$ 或其功能变体的信号传导部分的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR含有抗体例如抗体片段,跨膜结构域(其是CD28的跨膜部分或其功能变体或含有CD28的跨膜部分或其功能变体)以及含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体和CD3 $\zeta$ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些此类实施方案中,所述受体进一步包括含有Ig分子(如人Ig分子,如Ig铰链,例如IgG4铰链)的一部分的间隔子如仅含铰链的间隔子。

[0277] 在一些实施方案中,受体(例如CAR)的跨膜结构域是人CD28或其变体的跨膜结构域,例如人CD28(登录号:P10747.1)的27个氨基酸的跨膜结构域,或者是包含SEQ ID NO:77中所示氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:77至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的跨膜结构域;在一些实施方案中,含有重组受体的部分的跨膜结构域包含SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:78至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0278] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域。在一些方面,所述T细胞共刺激分子是CD28或41BB。

[0279] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含人CD28或其功能变体或部分的细胞内共刺激信号传导结构域,例如其41个氨基酸的结构域,和/或在天然CD28蛋白的位置186-187处具有LL至GG取代的这种结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域可以包含SEQ ID NO:79或80中所示的氨基酸序列,或展现与SEQ ID NO:79或80至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞内结构域包含4-1BB或其功能变体或部分的细胞内共刺激信号传导结构域,如人4-1BB(登录号Q07011.1)或其功能变体或部分的42个氨基酸的细胞质结构域,例如SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:81至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0280] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含人CD3 $\zeta$ 刺激性信号传导结构域或其功能变体,例如人CD3 $\zeta$ (登录号:P20963.2)的同种型3的112个AA的细胞质结构域或如美国专利号7,446,190或美国专利号8,911,993中所述的CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:82、83或84中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:82、83或84至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0281] 在一些方面,所述间隔子仅含有IgG的铰链区,如仅IgG4或IgG1的铰链,如SEQ ID NO:70中所示的仅铰链间隔子。在其他实施方案中,所述间隔子是与CH2和/或CH3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链。在一些实施方案中,所述间隔子是与CH2和CH3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:73中所列出。在一些实施方案中,所述间隔子是仅与CH3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:72中所列出。在一些实施方案中,所述间隔子是或包含富甘氨酸-丝氨酸的序列或其他柔性接头,如已知的柔性接头。

[0282] 2.T细胞受体

[0283] 在一些实施方案中,提供了工程化细胞(如T细胞),其表达识别靶多肽(如肿瘤、病

毒或自身免疫蛋白的抗原)的肽表位或T细胞表位的T细胞受体(TCR)或其抗原结合部分。

[0284] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是含有可变 $\alpha$ 和 $\beta$ 链(也分别称为TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ )或可变 $\gamma$ 和 $\delta$ 链(也分别称为TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ )的分子或其抗原结合部分,并且其能够特异性结合至与MHC分子结合的肽。在一些实施方案中,所述TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR一般在结构上相似,但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖位置或功能。TCR可以在细胞的表面上发现或以可溶形式发现。通常,发现TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上,在此处它通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。

[0285] 除非另有说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述TCR是完整或全长TCR,包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方案中,所述TCR是这样的抗原结合部分,其少于全长TCR但与在MHC分子中结合的特定肽结合(如与MHC-肽复合物结合)。在一些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅含有全长或完整TCR的结构域的一部分,但是仍能够结合与完整TCR结合的肽表位(如MHC-肽复合物)。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域(如TCR的可变 $\alpha$ 链和可变 $\beta$ 链),足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点。通常,TCR的可变链含有参与肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区。

[0286] 在一些实施方案中,TCR的可变结构域含有超变环或互补决定区(CDR),其通常是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区内的各个CDR通常由框架区(FR)隔开,与CDR相比,所述框架区通常在TCR分子之间展示较低可变性(参见,例如,Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或者是在给定TCR可变区的用于所述肽-MHC复合物的加工肽部分的抗原识别和/或用于与其相互作用的三个CDR中最重要的CDR。在一些情境下,所述 $\alpha$ 链的CDR1可以与某些抗原肽的N末端部分相互作用。在一些情境下,所述 $\beta$ 链的CDR1可以与所述肽的C末端部分相互作用。在一些情境下,CDR2对与所述MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别具有最强的作用或者是主要的负责CDR。在一些实施方案中,所述 $\beta$ -链的可变区可以含有另外的高变区(CDR4或HVR4),其通常参与超抗原结合而非抗原识别(Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews,8:411-426)。

[0287] 在一些实施方案中,TCR还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短细胞质尾(参见,例如,Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications,p.4:33,1997)。在一些方面,TCR的每条链可以具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和位于C末端的短细胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质缔合。

[0288] 在一些实施方案中,TCR链含有一个或多个恒定结构域。例如,给定TCR链的细胞外部分(例如, $\alpha$ 链或 $\beta$ 链)可以含有与细胞膜相邻的两个免疫球蛋白样结构域,例如可变结构域(例如,V $\alpha$ 或V $\beta$ ;通常基于Kabat编号的氨基酸1至116,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版)和恒定结构域(例如, $\alpha$ 链恒定域或C $\alpha$ ,通常基于Kabat编号的位置117至259,或 $\beta$ 链恒定结构域或C $\beta$ ,通常基于Kabat

的链的位置117至295)。例如,在一些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域,其中可变结构域各自含有CDR。TCR的恒定结构域可含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,由此连接TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR可在每条 $\alpha$ 和 $\beta$ 链中具有另外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0289] 在一些实施方案中,所述TCR链含有跨膜结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,所述TCR链含有胞质尾。在一些情况下,结构允许TCR与其他分子(如CD3和其亚基)缔合。例如,含有恒定结构域与跨膜区的TCR可以将所述蛋白质锚定在细胞膜中并与所述CD3信号传导装置或复合物的不变亚基缔合。CD3信号传导亚基(例如,CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 和CD3 $\zeta$ 链)的细胞内尾含有TCR复合物的信号传导能力中所涉及的一个或多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0290] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 $\alpha$ 和 $\beta$ (或者任选地 $\gamma$ 和 $\delta$ )的异二聚体,或者其可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有两条单独链( $\alpha$ 和 $\beta$ 链或 $\gamma$ 和 $\delta$ 链)的异二聚体,所述链是通过例如一个或多个二硫键连接。

[0291] 在一些实施方案中,TCR可以从一个或多个已知的TCR序列(如V $\alpha$ , $\beta$ 链的序列)产生,所述一个或多个已知的TCR序列的基本上全长的编码序列是易于获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是熟知的。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可以从多种来源获得,如通过一种或多种给定细胞内的或从所述一种或多种给定细胞分离的编码TCR的核酸的聚合酶链式反应(PCR)扩增获得,或者通过公众可获得的TCR DNA序列的合成获得。

[0292] 在一些实施方案中,TCR是从生物来源获得,如来自细胞(如来自T细胞,例如细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他公众可获得的来源。在一些实施方案中,T细胞可以从体内分离的细胞获得。在一些实施方案中,TCR是胸腺选择的TCR。在一些实施方案中,TCR是新表位限制性TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以从TCR序列的知识合成地产生。

[0293] 在一些实施方案中,TCR是从通过针对靶多肽抗原或其靶T细胞表位筛选候选TCR文库而鉴定或选择的TCR产生的。TCR文库可以通过扩增来自T细胞的V $\alpha$ 和V $\beta$ 库来产生,所述T细胞是从受试者分离,包括存在于PBMC、脾或其他淋巴器官中的细胞。在一些情况下,T细胞可以从肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)扩增。在一些实施方案中,可以从CD4 $^{+}$ 或CD8 $^{+}$ 细胞产生TCR文库。在一些实施方案中,所述TCR可以从正常或健康受试者的T细胞来源扩增,即正常TCR文库。在一些实施方案中,所述TCR可以从患病受试者的T细胞来源扩增,即患病TCR文库。在一些实施方案中,使用简并引物扩增V $\alpha$ 和V $\beta$ 的基因库,如通过在从人获得的样品(如T细胞)中进行RT-PCR。在一些实施方案中,scTv文库可以从天然V $\alpha$ 和V $\beta$ 文库组装,其中扩增的产物被克隆或组装以通过接头分开。取决于受试者和细胞的来源,所述文库可以是HLA等位基因特异性的。可替代地,在一些实施方案中,TCR文库可以通过亲本或支架TCR分子的诱变或多样化产生。在一些方面,所述TCR经受定向进化,如通过诱变例如所述 $\alpha$ 或 $\beta$ 链。在一些方面,所述TCR的CDR内的特定残基被改变。在一些实施方案中,可以通过亲和力成熟来修饰选择的TCR。在一些实施方案中,可以选择抗原特异性T细胞,如通过筛选以评估针对所述肽的CTL活性。在一些方面,可以选择例如存在于抗原特异性T细胞上的TCR,如通过结合活性,



例如对所述抗原的特定亲和力或亲合力。

[0294] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分是已经修饰或工程化的。在一些实施方案中,使用定向进化方法来产生具有改变的特性如具有较高的对特定MHC-肽复合物的亲和力的TCR。在一些实施方案中,通过展示方法来实现定向进化,所述展示方法包括但不限于酵母展示(Holler等人,(2003) *Nat Immunol*,4,55-62;Holler等人(2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*,97,5387-92)、噬菌体展示(Li等人(2005) *Nat Biotechnol*,23,349-54)、或T细胞展示(Chervin等人(2008) *J Immunol Methods*,339,175-84)。在一些实施方案中,展示途径涉及工程化或修饰已知的亲本或参考TCR。例如,在一些情况下,野生型TCR可以用作模板以用于产生诱变的TCR,其中CDR的一个或多个残基被突变,并且选择具有所需改变的特性(如对所需靶抗原具有更高的亲和力)的突变体。

[0295] 在一些实施方案中,用于产生或生成目标TCR的靶多肽的肽是已知的或可以由熟练技术人员容易地鉴定。在一些实施方案中,适用于产生TCR或抗原结合部分的肽可以基于目标靶多肽(如下文所述的靶多肽)中HLA限制性基序的存在来确定。在一些实施方案中,使用本领域技术人员已知的计算机预测模型鉴定肽。在一些实施方案中,对于预测MHC I类结合位点,此类模型包括但不限于ProPred1 (Singh和Raghava (2001) *Bioinformatics* 17 (12): 1236-1237) 和SYFPEITHI (参见Schuler等人(2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*,409 (1):75-93 2007)。在一些实施方案中,MHC限制性表位是HLA-A0201,其在所有高加索人的约39%-46%中表达,并因此代表用于制备TCR或其他MHC-肽结合分子的MHC抗原的合适选择。

[0296] 使用计算机预测模型的HLA-A0201结合基序以及蛋白酶体和免疫蛋白酶体的切割位点是本领域技术人员已知的。对于预测MHC I类结合位点,此类模型包括但不限于ProPred1 (更详细地描述于Singh和Raghava,ProPred:prediction of HLA-DR binding sites.BIOINFORMATICS 17 (12):1236-1237 2001中) 和SYFPEITHI (参见Schuler等人SYFPEITHI,Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction.于Immunoinformatics Methods in Molecular Biology,第409 (1) 卷:75-93 2007)。

[0297] 在一些实施方案中,所述TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白质或其突变形式(其中一种或多种特性(如结合特征)已经被改变)。在一些实施方案中,TCR可以来源于各种动物物种之一,如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的或呈可溶形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,所述TCR呈在细胞的表面上表达的细胞结合形式。

[0298] 在一些实施方案中,所述TCR是全长TCR。在一些实施方案中,所述TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,所述TCR是二聚体TCR (dTCR)。在一些实施方案中,所述TCR是单链TCR (sc-TCR)。在一些实施方案中,dTCR或scTCR具有如WO 03/020763、WO 04/033685、WO 2011/044186中所述的结构。

[0299] 在一些实施方案中,TCR含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中,所述TCR确实含有对应于胞质序列的序列。在一些实施方案中,所述TCR能够与CD3形成TCR复合物。在一些实施方案中,任何TCR (包括dTCR或scTCR) 可以与在T细胞的表面上产生活性TCR的信号传导结构域连接。在一些实施方案中,所述TCR在细胞的表面上表达。

[0300] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽(其中对应于TCR $\alpha$ 链可变区序列的序列与



对应于TCR $\alpha$ 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合)和第二多肽(其中对应于TCR $\beta$ 链可变区序列的序列与对应于TCR $\beta$ 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合),所述第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,所述键可以对应于天然二聚 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,所述链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键。在一些实施方案中,所述TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0301] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR $\alpha$ 链(含有可变 $\alpha$ 结构域、恒定 $\alpha$ 结构域和附接至恒定 $\alpha$ 结构域C末端的第一二聚化基序)和TCR $\beta$ 链(包含可变 $\beta$ 结构域、恒定 $\beta$ 结构域和附接至恒定 $\beta$ 结构域C末端的第一二聚化基序),其中所述第一和第二二聚化基序易于相互作用以在第一二聚化基序的氨基酸与第二二聚化基序的氨基酸之间形成共价键,从而将TCR $\alpha$ 链与TCR $\beta$ 链连接在一起。

[0302] 在一些实施方案中,TCR是scTCR。通常,可以使用本领域技术人员已知的方法来生成scTCR,参见例如,Soo Hoo, W.F.等人PNAS (USA) 89,4759 (1992); Wülfing, C.和Plückthun, A., J.Mol.Biol.242,655 (1994); Kurucz, I.等人PNAS (USA) 90 3830 (1993); 国际公开的PCT号W0 96/13593、W0 96/18105、W0 99/60120、W0 99/18129、W0 03/020763、W0 2011/044186;以及Schlueter, C.J.等人J.Mol.Biol.256,859 (1996)。在一些实施方案中,scTCR含有引入的非天然链间二硫键以促进TCR链的缔合(参见,例如,国际公开PCT号W0 03/020763)。在一些实施方案中,scTCR是非二硫键连接的截短的TCR,其中与其C末端融合的异源亮氨酸拉链促进链缔合(参见例如国际公开的PCT号W0 99/60120)。在一些实施方案中,scTCR含有经由肽接头与TCR $\beta$ 可变结构域共价连接的TCR $\alpha$ 可变结构域(参见例如,国际公开的PCT号W0 99/18129)。

[0303] 在一些实施方案中,scTCR含有由对应于TCR $\alpha$ 链可变区的氨基酸序列构成的第一区段、由对应于TCR $\beta$ 链可变区序列的氨基酸序列构成的第二区段(融合至对应于TCR $\beta$ 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端)和将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端的接头序列。

[0304] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 $\alpha$ 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的 $\alpha$ 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 $\beta$ 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 $\beta$ 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将所述第一区段的C末端连接至所述第二区段的N末端)。

[0305] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 $\beta$ 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCR $\beta$ 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 $\alpha$ 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 $\alpha$ 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将所述第一区段的C末端连接至所述第二区段的N末端)。

[0306] 在一些实施方案中,scTCR的连接所述第一和第二TCR区段的接头可以是能够形成单多肽链同时保留TCR结合特异性的任何接头。在一些实施方案中,接头序列可例如具有式-P-AA-P-,其中P是脯氨酸并且AA代表氨基酸序列,其中所述氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中,所述第一和第二区段配对,使得其可变区序列定向用于这种结合。因此,在一些情况下,所述接头具有足够的长度以跨越所述第一区段的C末端与所述第二区段的N末端之间的距离,或反之亦然,但是不能太长以阻断或减少所述scTCR与所述靶配体的

结合。在一些实施方案中,所述接头可以含有为或为约10至45个氨基酸,如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基,例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头具有式-PGGG-(SGGGG)<sub>5</sub>-P-,其中P是脯氨酸,G是甘氨酸,并且S是丝氨酸(SEQ ID NO:89)。在一些实施方案中,所述接头具有序列GSADDAKKDAKKDGKS(SEQ ID NO:90)

[0307] 在一些实施方案中,scTCR含有共价二硫键,其将 $\alpha$ 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基连接至 $\beta$ 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基。在一些实施方案中,天然TCR中不存在链间二硫键。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入scTCR多肽的第一和第二区段的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键。

[0308] 在含有引入的链间二硫键的dTCR或scTCR的一些实施方案中,不存在天然二硫键。在一些实施方案中,用形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸取代另一残基,如取代丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,可以通过使第一和第二区段上的非半胱氨酸残基突变为半胱氨酸来形成引入的二硫键。TCR的示例性非天然二硫键描述于已公开的国际PCT号WO 2006/000830中。

[0309] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合片段对靶抗原以平衡结合常数展现亲和力,所述平衡结合常数是在或在约10<sup>-5</sup>M与10<sup>-12</sup>M之间以及其中的所有单独值和范围。在一些实施方案中,靶抗原是MHC-肽复合物或配体。

[0310] 在一些实施方案中,编码TCR(如 $\alpha$ 和 $\beta$ 链)的一种或多种核酸可以通过PCR、克隆或其他合适的方法扩增,并且克隆到合适的表达载体中。所述表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于两者的那些,如质粒和病毒。

[0311] 在一些实施方案中,载体可以是以下系列的载体:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,加利福尼亚州拉霍亚)、pET系列(Novagen,威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,瑞典乌普萨拉)或pEX系列(Clontech,加利福尼亚州帕罗奥图)。在一些情况下,也可以使用噬菌体载体,如 $\lambda$ G10、 $\lambda$ GT11、 $\lambda$ ZapII(Stratagene)、 $\lambda$ EMBL4和 $\lambda$ NM1149。在一些实施方案中,可以使用植物表达载体,并且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中,动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。在一些实施方案中,使用病毒载体,如逆转录病毒载体。

[0312] 在一些实施方案中,可以使用标准重组DNA技术来制备所述重组表达载体。在一些实施方案中,载体可以含有调节序列,如转录和翻译起始和终止密码子,其对引入载体的宿主(例如,细菌、真菌,植物或动物)的类型具特异性,酌情并考虑所述载体是基于DNA还是基于RNA。在一些实施方案中,载体可以含有非天然启动子,其可操作地连接至编码TCR或抗原结合部分(或其他MHC-肽结合分子)的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还考虑了熟练技术人员已知的其他启动子。

[0313] 在一些实施方案中,为了产生编码TCR的载体,将 $\alpha$ 和 $\beta$ 链从表达目标TCR的T细胞克隆分离的总cDNA进行PCR扩增,并将其克隆到表达载体中。在一些实施方案中,将所述 $\alpha$ 和 $\beta$ 链克隆到同一载体中。在一些实施方案中,将所述 $\alpha$ 和 $\beta$ 链克隆到不同的载体中。在一些实施

方案中,将所产生的 $\alpha$ 和 $\beta$ 链掺入逆转录病毒(例如慢病毒)载体中。

### [0314] 3. 嵌合自身抗体受体 (CAAR)

[0315] 在一些实施方案中,重组受体是嵌合自身抗体受体 (CAAR)。在一些实施方案中,CAAR对自身抗体具有特异性。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞(例如工程化以表达CAAR的T细胞)可以用于特异性地结合至并杀伤表达自身抗体的细胞,而不是表达正常抗体的细胞。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以用于治疗与自身抗原的表达相关的自身免疫性疾病,例如自身免疫性疾病。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以靶向最终产生自身抗体并在其细胞表面上展示所述自身抗体的B细胞,将这些B细胞标记为治疗干预的疾病特异性靶标。在一些实施方案中,CAAR表达细胞可以用于通过使用抗原特异性嵌合自身抗体受体靶向引起疾病的B细胞,有效靶向和杀伤自身免疫性疾病中的致病性B细胞。在一些实施方案中,重组受体是CAAR,例如美国专利申请公开号US 2017/0051035中所述的任何一种。

[0316] 在一些实施方案中,CAAR包含自身抗体结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导区域。在一些实施方案中,细胞内信号传导区域包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域是或包含主要信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体 (TCR) 组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导区域包含次级或共刺激信号传导区域(次级细胞内信号传导区域)。

[0317] 在一些实施方案中,自身抗体结合结构域包含自身抗原或其片段。自身抗原的选择可以取决于所靶向的自身抗体的类型。例如,所述自身抗原的选择可能是由于其识别与特定疾病状态(例如自身免疫性疾病,例如自身抗体介导的自身免疫性疾病)相关的靶细胞(例如B细胞)上的自身抗体。在一些实施方案中,自身免疫性疾病包括寻常型天疱疮 (PV)。示例性自身抗原包括桥粒芯糖蛋白1 (Dsg1) 和Dsg3。

### [0318] B. 核酸和载体

[0319] 提供了编码细胞表面缀合物和重组受体的多核苷酸(核酸分子)、用于将细胞基因工程化以表达此类缀合物和受体的载体、以及用于产生所述工程化细胞的方法。

[0320] 在一些实施方案中,提供了编码本文提供的任何细胞表面缀合物的多核苷酸。在一些方面,所述多核苷酸含有单一编码序列,如仅编码细胞表面缀合物的编码序列。在其他情形中,所述多核苷酸含有至少两个不同的编码序列,如编码细胞表面缀合物的第一核酸序列和编码重组受体的第二核酸序列。在一些方面,所述重组受体是或含有嵌合抗原受体 (CAR)。在一些方面,所述重组受体是或含有T细胞受体 (TCR),例如转基因TCR。在一些方面,所述重组受体是或含有嵌合自身抗体受体 (CAAR)。在一些实施方案中,所述多核苷酸和载体用于在细胞中共表达所述细胞表面缀合物和所述重组受体。在一些实施方案中,所述多核苷酸编码能够在细胞表面上表达的细胞表面缀合物。在一些实施方案中,编码所述细胞表面缀合物的核酸编码包含细胞外部分和跨膜部分的细胞表面分子。

[0321] 在一些情况下,编码所述缀合物的核酸序列含有编码信号肽的信号序列。在一些方面,所述信号序列可以编码衍生自天然细胞表面分子的信号肽。在其他方面,所述信号序列可以编码异源或非天然信号肽,例如SEQ ID NO:48中所示并且由SEQ ID NO:47中所示核苷酸序列编码的GMCSFR $\alpha$ 链的示例性信号肽。

[0322] 在一些情况下,编码所述嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列含有编码信号肽的信号序列。信号肽的非限制性示例性例子包括,例如,在SEQ ID NO:48中所示的GMCSFR $\alpha$ 链信号肽或在SEQ ID NO:75中所示的CD8 $\alpha$ 信号肽。

[0323] 在一些实施方案中,编码细胞表面缀合物和/或重组受体的多核苷酸含有至少一个启动子,所述至少一个启动子可操作地连接以控制细胞表面缀合物和/或重组受体的表达。在一些例子中,所述多核苷酸含有两个、三个或更多个启动子,所述启动子可操作地连接以控制细胞表面缀合物和/或重组受体的表达。

[0324] 在其中核酸分子编码两条或更多条不同多肽链的某些情况下,多肽链中的每一条可以由单独的核酸分子编码。例如,提供了两个单独的核酸,并且每一个可以单独转移到或引入细胞中以在细胞中表达。

[0325] 在一些实施方案中,例如在多核苷酸含有第一和第二核酸序列的那些实施方案中,编码每种不同多肽链的编码序列可以与启动子可操作地连接,所述启动子可以是相同的或不同的。在一些实施方案中,所述核酸分子可以含有驱动两条或更多条不同多肽链表达的启动子。在一些实施方案中,此类核酸分子可以是多顺反子的(双顺反子的或三顺反子的,参见例如,美国专利号6,060,273)。在一些实施方案中,可以将转录单位工程化为含有IRES(内部核糖体进入位点)的双顺反子单元,其允许通过来自单一启动子的信息共表达基因产物(例如其编码所述缀合物和编码所述重组受体)。可替代地,在一些情况下,单一启动子可引导RNA的表达,所述RNA在单一开放阅读框(ORF)中含有两个或三个基因(例如编码所述缀合物和编码所述重组受体),所述基因通过编码自切割肽(例如,2A序列)的序列或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶(furin))彼此分开。因此,所述ORF编码单个多肽,其在翻译期间(在2A的情况下)或翻译后被加工成单个蛋白质。在一些情况下,所述肽(如T2A)可以导致核糖体跳过(核糖体跳跃)2A元件C末端处的肽键的合成,这导致2A序列末端与下游的下一个肽之间的分离(参见例如,de Felipe.Genetic Vaccines and Ther.2:13(2004)和deFelipe等人Traffic 5:616-626(2004))。许多2A元件在本领域是已知的。可以用于本文所公开的方法和系统中的2A序列的例子包括但不限于来自以下病毒的2A序列:口蹄疫病毒(F2A,例如,SEQ ID NO:88)、马鼻肺炎病毒(E2A,例如,SEQ ID NO:87)、明脉扁刺蛾 $\beta$ 四体病毒(T2A,例如,SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:76)和猪捷申病毒-1(P2A,例如,SEQ ID NO:85或86),如美国专利公开号20070116690中所述。

[0326] 在一些实施方案中,例如通过逆转录病毒转导、转染或转化将编码细胞表面缀合物和/或重组受体的多核苷酸引入含有培养细胞的组合物中。

[0327] 还提供了多核苷酸的集合或组合。在一些实施方案中,所述集合或组合包含第一多核苷酸和第二多核苷酸,所述第一多核苷酸包含编码细胞表面缀合物(如本文描述的任何一种)的核酸,所述第二多核苷酸包含编码重组受体的核酸。还提供了含有多核苷酸的这种集合或组合的组合物。在一些实施方案中,多核苷酸的所述集合或组合一起用于细胞的工程化。在一些实施方案中,将所述集合中的第一和第二多核苷酸同时或顺序地以任何顺序引入用于工程化的细胞中。在一些实施方案中,存在包含第一多核苷酸和第二多核苷酸的多核苷酸的集合,所述第一多核苷酸包含编码细胞表面缀合物(如本文描述的任何一种)的核酸,所述第二多核苷酸包含编码嵌合受体和/或重组抗原受体的核酸。

[0328] 还提供了含有此类核酸分子的载体或构建体。在一些实施方案中,所述载体或构

建体含有一个或多个启动子,所述一个或多个启动子与编码所述多肽或受体的核苷酸可操作地连接以驱动所述核苷酸的表达。在一些实施方案中,所述启动子可操作地连接至一个或多于一个核酸分子。因此,还提供了载体,如含有本文所提供的任何多核苷酸的那些。在一些情况下,所述载体是病毒载体,如逆转录病毒载体,例如慢病毒载体或 $\gamma$ 逆转录病毒载体。

[0329] 还提供了载体的集合或组合。在一些实施方案中,载体的所述集合或组合包含第一载体和第二载体,其中所述第一载体包含第一多核苷酸,例如编码细胞表面缀合物的第一多核苷酸,并且所述第二载体包含编码重组受体(例如CAR)的第二多核苷酸。还提供了含有载体的这种集合或组合的组合物。在一些实施方案中,所述载体的所述集合或组合一起用于细胞的工程化。在一些实施方案中,将所述集合中的第一载体和第二载体同时或顺序地以任何顺序引入用于工程化的细胞中。

[0330] 在一些实施方案中,所述载体包括病毒载体,例如逆转录病毒或慢病毒、非病毒载体或转座子,例如睡美人(Sleeping Beauty)转座子系统;源自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体;慢病毒载体或逆转录病毒载体,如 $\gamma$ -逆转录病毒载体;源自莫洛尼(Moloney)鼠白血病病毒(MoMLV)、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)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。

[0331] 本文描述的任何细胞表面缀合物和/或重组受体可以由呈任何组合或排列的含有编码细胞表面缀合物和/或重组受体的一种或多种核酸序列的多核苷酸编码。例如,一种、两种、三种或更多种多核苷酸可以编码一种、两种、三种或更多种不同的多肽,例如细胞表面缀合物和/或重组受体。在一些实施方案中,一种载体或构建体含有编码细胞表面缀合物的核酸序列,并且单独的载体或构建体含有编码重组受体(例如CAR)的核酸序列。在一些实施方案中,编码细胞表面缀合物的核酸和编码重组受体的核酸可操作地连接至两个不同的启动子。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸存在于编码细胞表面缀合物的核酸的下游。

[0332] C. 用于工程化的细胞和细胞的制备

[0333] 还提供了细胞,如含有细胞表面缀合物和/或工程化重组受体的细胞,如本文描述的。还提供了此类细胞的群体、含有此类细胞和/或富含此类细胞的组合物,例如其中表达细胞表面缀合物和/或重组受体(例如嵌合受体)的细胞构成组合物中总细胞的或某种类型的细胞(如T细胞或CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>细胞)的至少50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或更高百分比。所述组合物包括用于给予(如用于过继细胞疗法)的药物组合物和配制品。还提供了用于向受试者(例如,患者)给予所述细胞和组合物的治疗方法。

[0334] 因此,还提供了表达细胞表面缀合物和/或重组受体(例如CAR)的基因工程化细胞。细胞通常是真核细胞,例如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方案中,所述细胞源自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,如先天免疫或适应性免疫的细胞,例如骨髓或淋巴细胞,包括淋巴细胞,通常为T细胞和/或NK细胞。其他示例性细胞包括干细胞,如多潜能干细胞和多能干细胞,包括诱导多能干细胞(iPSC)。细胞通常是原代细胞如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些原代细胞。在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,如整个T细胞群、CD4<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>细胞及其亚

群,如由以下各项所定义的那些亚群:功能、激活状态、成熟度、分化的可能性、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记或细胞因子分泌特征和/或分化程度。关于待治疗的受试者,细胞可以是同种异体的和/或自体的。所述方法包括现成的方法。在一些方面,如对于现有技术,所述细胞是多能和/或多潜能的,如干细胞,如诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从所述受试者中分离细胞,如本文描述的制备、加工、培养和/或工程化它们,并且在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者体内。

[0335] T细胞和/或CD4+和/或CD8+T细胞的亚型和亚群包括幼稚T( $T_N$ )细胞、效应T细胞( $T_{EFF}$ )、记忆T细胞及其亚型(如干细胞记忆T( $T_{SCM}$ )、中枢记忆T( $T_{CM}$ ),效应记忆T( $T_{EM}$ )或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T( $T_{reg}$ )细胞、辅助T细胞(如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助细胞T细胞)、 $\alpha/\beta$ T细胞和 $\delta/\gamma$ T细胞。

[0336] 在一些实施方案中,所述细胞是天然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,所述细胞是单核细胞或粒细胞,例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

[0337] 在一些实施方案中,所述细胞包括经由基因工程引入的一种或多种核酸,从而表达此类核酸的重组或基因工程化产物。在一些实施方案中,核酸是异源的,即通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中,如从另一种生物或细胞获得的核酸,例如,所述核酸通常不在被工程化的细胞和/或这种细胞所来源的生物中发现。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的如自然界中未发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0338] 在一些实施方案中,工程化细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。用于引入细胞表面缀合物和/或重组受体(例如CAR)的细胞可以从样品(如生物样品,例如获自或源自受试者的一种样品)中分离。在一些实施方案中,分离出细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将其给予细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,所述受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,其中细胞被分离、加工和/或工程化)的人。

[0339] 因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及来自一个或多个加工步骤(如分离、离心、基因工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)的样品。所述生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括由其衍生的加工样品。

[0340] 在一些方面,细胞从其中衍生或分离的样品是血液或血液衍生的样品,或者是或源自单采术或白细胞分离术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法例如过继细胞疗法的背景下,样品包括来自自体同源和同种异体来源的样品。

[0341] 在一些实施方案中,细胞源自细胞系,例如,T细胞系。在一些实施方案中,细胞获

得自异种来源,例如获得自小鼠、大鼠、非人灵长类动物或猪。

[0342] 在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在存在一种或多种试剂的情况下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、针对所需组分进行富集、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0343] 在一些例子中,来自受试者的循环血液的细胞例如通过单采术或白细胞分离术获得。在一些方面,所述样品含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除红细胞和血小板之外的细胞。

[0344] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞,例如以去除血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于随后的加工步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤所述细胞。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面,根据制造商的说明书通过半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面,根据制造商的说明书通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将所述细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如像不含Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将所述细胞直接重悬于培养基中。

[0345] 在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0346] 在一些实施方案中,分离方法包括基于细胞中一种或多种特定分子(如表面标记,例如表面分子或表面蛋白、细胞内标记或核酸)的表达或存在来分离不同细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的基于此类标记的用于分离的方法。在一些实施方案中,所述分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,所述分离包括基于所述细胞的一种或多种标记(通常为细胞表面标记、表面分子或表面蛋白)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过和与此类标记特异性结合的抗体或结合配偶体一起孵育,然后通常是洗涤步骤和从那些未与所述抗体或结合配偶体结合的细胞中分离已结合所述抗体或结合配偶体的细胞。

[0347] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合所述试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留未与所述抗体或结合配偶体结合的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面,在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下,阴性选择可能特别有用,使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记进行分离。

[0348] 所述分离不需要导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标记的细胞。例如,针对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要导致不表达所述标记的细胞的完全不存在。同样地,特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少此类细胞的数量或百分比,但不需要导致所有此类细胞的完全去除。

[0349] 在一些例子中,进行多轮分离步骤,其中来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经受另一个分离步骤,如随后的阳性或阴性选择。在一些例子中,单个分离步骤可以同时耗



尽表达多种标记的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(每种抗体或结合配偶体对被靶向用于阴性选择的标记具特异性)一起孵育。同样地,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育,可以同时阳性选择多种细胞类型。

[0350] 例如,在一些方面,T细胞的特定亚群,如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如CD28<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD127<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>和/或CD45RO<sup>+</sup>T细胞)通过阳性或阴性选择技术来分离。

[0351] 例如,可以使用抗CD3/抗CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS<sup>®</sup>M-450 CD3/CD28 T Cell Expander)阳性选择CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>T细胞。

[0352] 在一些实施方案中,通过阳性选择针对特定细胞群富集或者通过阴性选择针对特定细胞群耗尽来进行分离。在一些实施方案中,通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育来完成阳性或阴性选择,所述一种或多种抗体或其他结合剂与分别在阳性或阴性选择的细胞上表达或以相对较高水平(标记高)(标记<sup>+</sup>)的一种或多种表面标记特异性结合。

[0353] 在一些实施方案中,通过阴性选择非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞,如CD14)上表达的标记,将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面,CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>选择步骤用于分离CD4<sup>+</sup>辅助细胞和CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞。此类CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>群体可以通过针对在一种或多种幼稚T细胞、记忆T细胞和/或效应T细胞子群体上表达或表达至相对较高程度的标记进行阳性或阴性选择来进一步分选为子群体。

[0354] 在一些实施方案中,如通过基于与相应子群体相关的表面抗原进行阳性或阴性选择,将CD8<sup>+</sup>细胞针对幼稚、中枢记忆、效应子记忆和/或中枢记忆干细胞进一步富集或耗尽。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(TCM)细胞进行富集以增加功效,如以改善给予后的长期存活、扩增和/或移植,这在一些方面在此类亚群中特别稳健。参见Terakura等人(2012) Blood.1:72-82;Wang等人(2012) J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方案中,组合富含TCM的CD8<sup>+</sup>T细胞与CD4<sup>+</sup>T细胞进一步增强功效。

[0355] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8<sup>+</sup>外周血淋巴细胞的CD62L<sup>+</sup>和CD62L<sup>-</sup>两个子集中。可以例如使用抗CD8和抗CD62L抗体将PBMC针对CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>和/或CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>级分进行富集或耗尽。

[0356] 在一些实施方案中,中枢记忆T(TCM)细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD 127的阳性或高表面表达;在一些方面,它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,通过表达CD4、CD14、CD45RA的细胞的耗尽和表达CD62L的细胞的阳性选择或富集来进行富含TCM细胞的CD8<sup>+</sup>群体的分离。在一个方面,中枢记忆T(TCM)细胞的富集从基于CD4表达所选择的阴性细胞级分开始进行,所述阴性细胞级分基于CD14和CD45RA的表达进行阴性选择且基于CD62L进行阳性选择。在一些方面这种选择是同时进行的,而在其他方面以任何顺序依次进行。在一些方面,用于制备CD8<sup>+</sup>细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成CD4<sup>+</sup>细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。

[0357] 在特定例子中,PBMC样品或其他白细胞样品进行CD4<sup>+</sup>细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分。然后所述阴性级分基于CD14和CD45RA或RO1的表达进行阴性选择,并基于



中枢记忆T细胞(如CD62L或CCR7)的标记特征进行阳性选择,其中以任何顺序进行所述阳性和阴性选择。

[0358] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4+T辅助细胞分类为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4+淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方案中,幼稚CD4+T淋巴细胞是CD45R0<sup>-</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD4+T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞是CD62L<sup>+</sup>和CD45R0<sup>+</sup>。在一些实施方案中,效应CD4+细胞是CD62L<sup>-</sup>和CD45R0<sup>-</sup>。

[0359] 在一个例子中,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合剂通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中,所述抗体或结合配偶体与固体支撑物或基质(如磁珠或顺磁珠)结合,以允许细胞分离以用于阳性和/或阴性选择。例如,在一些实施方案中,使用免疫磁性(或亲和磁性)分开技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于Methods in Molecular Medicine,第58卷:Metastasis Research Protocols,第2卷:Cell Behavior In Vitro and In Vivo,第17-25页S.A.Brooks和U.Schumacher编辑©Humana Press Inc.,新泽西州托托瓦)。

[0360] 在一些方面,将待分离的细胞的样品或组合物与小的可磁化或磁响应材料(如磁响应颗粒或微粒,如顺磁珠(例如像Dynabeads®或MACS®珠))一起孵育。磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体与希望分离(例如,希望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记)特异性结合。

[0361] 在一些实施方案中,所述磁性颗粒或珠包含与特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。有许多在磁分离方法中使用的熟知的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在Molday,美国专利号4,452,773和在欧洲专利说明书EP 452342 B(将其通过引用特此并入)中描述的那些。胶体大小的颗粒,如在Owen美国专利号4,795,698以及Liberti等人,美国专利号5,200,084中描述的那些是其他例子。

[0362] 所述孵育通常在这样的条件下进行,由此抗体或结合配偶体或者与附着于磁性颗粒或珠的此类抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与细胞表面分子(如果存在于所述样品内的细胞上的话)特异性结合。

[0363] 在一些方面,将所述样品置于磁场中,并且具有附着于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁铁吸引的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在同一选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步加工或经受另外的分离步骤。

[0364] 在某些实施方案中,该磁响应颗粒被包被在一抗或其他结合伴侣、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,所述磁性颗粒通过对一种或多种标记具特异性的一抗的包被而附着于细胞。在某些实施方案中,用一抗或结合配偶体标记所述细胞而不是珠,并且然后添加细胞类型特异性二抗或其他结合配偶体(例如链霉亲和素)包被的磁性颗粒。在某些实施方案中,将链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化的一抗或二抗结合使用。

[0365] 在一些实施方案中,所述磁响应颗粒保持附着于所述细胞,所述细胞随后被孵育,培养和/或工程化;在一些方面,所述颗粒保持附着于所述细胞以用于给予患者。在一些实施方案中,从所述细胞中去除可磁化或磁响应颗粒。用于从细胞中去除可磁化颗粒的方法

是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体、可磁化颗粒或与可切割接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0366] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活细胞分选 (MACS) (Miltenyi Biotec,加利福尼亚州奥本)。磁激活细胞分选 (MACS) 系统能够高纯度选择附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以这样的模式操作,其中在施加外部磁场之后依次洗脱非靶标和靶标种类。也就是说,附着于磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而未附着的种类被洗脱。然后,在完成第一次洗脱步骤之后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,所述非靶细胞被标记并从异质细胞群中耗尽。

[0367] 在某些实施方案中,使用这样的系统、设备或装置进行分离或分开,所述系统、设备或装置进行所述方法的分离、细胞制备、分开、加工、孵育、培养和/或制备步骤中的一种或多种。在一些方面,所述系统用于在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如以最小化错误、用户操作和/或污染。在一个例子中,所述系统是如国际专利申请公开号 W0 2009/072003或US 20110003380 A1中所述的系统。

[0368] 在一些实施方案中,所述系统或装置在集成或独立系统中和/或以自动或可编程方式进行分离、加工、工程化和配制步骤中的一个或多个(例如,全部)。在一些方面,所述系统或装置包括与所述系统或装置通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对加工、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、评估其结果和/或调整。

[0369] 在一些方面,使用CliniMACS系统 (Miltenyi Biotec) 进行所述分离和/或其他步骤,例如以用于在封闭和无菌系统中在临床规模水平上自动分离细胞。部件可以包括集成微计算机、磁分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面,所述集成计算机控制所述仪器的所有部件并指示所述系统以标准化顺序执行重复程序。在一些方面,所述磁分离单元包括可移动的永磁体和用于选择柱的支架。所述蠕动泵控制整个管组的流速,并与夹管阀一起确保缓冲液通过所述系统的受控流动和细胞的连续悬浮。

[0370] 在一些方面,所述CliniMACS系统使用抗体偶联的可磁化颗粒,其在无菌,无热原的溶液中提供。在一些实施方案中,在用磁性颗粒标记细胞后,洗涤所述细胞以去除过量的颗粒。然后将细胞制备袋连接到管组,所述管组又连接到含有缓冲液的袋和细胞收集袋。所述管组由预装配的无菌管(包括预柱和分离柱)组成,并且仅供一次性使用。在启动分离程序后,所述系统自动将细胞样品施加到分离柱。标记的细胞保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤去除。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群是未标记的并且不保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群被标记并保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群在去除磁场后从柱中洗脱,并且收集在细胞收集袋内。

[0371] 在某些实施方案中,使用CliniMACS Prodigy系统 (Miltenyi Biotec) 进行分离和/或其他步骤。在一些方面,CliniMACS Prodigy系统配备有细胞加工联合体,其允许通过离心自动化洗涤和分级分离细胞。CliniMACS Prodigy系统还可以包括机载相机和图像识别软件,其通过辨别源细胞产物的宏观层来确定最佳的细胞分级分离终点。例如,可以将外周血自动分离成红细胞、白细胞和血浆层。所述CliniMACS Prodigy系统还可以包括集成的细胞培养室,其实现细胞培养方案,例如像细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输

入端口可以允许无菌移除和补充培养基,并且可以使用集成显微镜监测细胞。参见例如,Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 1:72-82;和Wang等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :689-701。

[0372] 在一些实施方案中,通过流式细胞术收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群,其中针对多种细胞表面标记染色的细胞在流体流中载携。在一些实施方案中,通过制备规模(FACS)分类收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群(参见例如,WO 2010/033140, Cho等人(2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573;和Godin等人(2008) *J Biophoton.* 1 (5) :355-376)。在两种情况下,细胞可以用多种标记来标记,允许以高纯度分离明确定义的T细胞子集。

[0373] 在一些实施方案中,用一种或多种可检测标记来标记抗体或结合配偶体,以促进分离供阳性和/或阴性选择。例如,分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。在一些例子中,基于对一种或多种细胞表面标记具特异性的抗体或其他结合配偶体的结合来分离细胞在流体流中载携,如通过荧光激活细胞分选(FACS),包括制备规模(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如与流式细胞检测系统组合。此类方法允许基于多种标记同时进行阳性和阴性选择。

[0374] 在一些实施方案中,所述制备方法包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)所述细胞的步骤。在一些实施方案中,所述冷冻和后续解冻步骤去除所述细胞群中的粒细胞,并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤之后将所述细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个例子涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻培养基。然后将其用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后将所述细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。

[0375] 在一些实施方案中,所提供的方法包括养殖、孵育、培养和/或基因工程步骤。例如,在一些实施方案中,提供了用于孵育耗尽的细胞群和培养起始组合物和/或将它们工程化的方法。

[0376] 因此,在一些实施方案中,在培养起始组合物中孵育细胞群。孵育和/或工程化可以在培养容器中进行,所述培养容器是如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或其他用于培养或培育细胞的容器。

[0377] 在一些实施方案中,在基因工程化之前或与其相连地孵育和/或培养细胞。所述孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂的存在下孵育所述组合物或细胞。这些条件包括针对以下而设计的那些条件:用于诱导群体中细胞的增殖、扩增、激活和/或存活的条件,用于模拟抗原暴露和/或用于引发细胞进行基因工程化,如以引入重组抗原受体。

[0378] 条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0379] 在一些实施方案中,刺激条件或药剂包括一种或多种药剂(例如配体),其能够激

活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在一些方面,所述药剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可以包括例如结合至固体支撑物(如珠)的抗体,如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的抗体(例如抗CD3、抗CD28);和/或一种或多种细胞因子。任选地,所述扩增方法还可以包括向培养基中(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,IL-2浓度为至少约10单位/mL。

[0380] 在一些方面,孵育是根据多种技术来进行,例如以下文献中所述的那些技术:授予Riddell等人的美国专利号6,040,177;Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 1:72-82;和/或Wang等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :689-701。

[0381] 在一些实施方案中,通过以下方法扩增T细胞:向培养起始组合物中加入饲养细胞(如非分裂外周血单核细胞(PBMC))(例如,使得所得细胞群含有至少约5、10、20或40种或更多种PBMC饲养细胞,以使初始群体中的每种T淋巴细胞进行扩增);以及孵育培养物(例如,持续足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面,非分裂饲养细胞可包含 $\gamma$ 辐射的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,用约3000至3600拉德范围内的 $\gamma$ 射线照射PBMC以防止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群之前将饲养细胞加入到培养基中。

[0382] 在一些实施方案中,所述刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,通常为至少约30摄氏度,并且通常在或约在37摄氏度。任选地,所述孵育还可以包括添加非分裂EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用在约6000至10,000拉德范围内的 $\gamma$ 射线照射LCL。在一些方面,所述LCL饲养细胞以任何合适的量(如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1)提供。

[0383] 在实施方案中,通过用抗原刺激幼稚或抗原特异性T淋巴细胞获得抗原特异性T细胞如抗原特异性CD4+和/或CD8+T细胞。例如,可通过从感染的受试者分离T细胞并用相同的抗原在体外刺激细胞,针对巨细胞病毒抗原生成抗原特异性T细胞系或克隆。

[0384] D. 用于基因工程的载体和方法

[0385] 用于引入基因工程化组分例如细胞表面缀合物和重组受体(例如CAR或TCR)的各种方法是熟知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。示例性方法包括用于转移编码多肽或受体的核酸的那些方法,包括经由病毒载体,例如逆转录病毒或慢病毒、非病毒载体或转座子(例如睡美人(Sleeping Beauty)转座子系统)。基因转移的方法可以包括转导、电穿孔或导致基因转移到细胞中的其他方法。

[0386] 在一些实施方案中,通过以下方式完成基因转移:首先刺激细胞,如通过将其与诱导反应(如增殖、存活和/或激活)的刺激物进行组合,例如如通过细胞因子或激活标记的表达测量的,然后转导激活的细胞,并且在培养物中扩增至足以用于临床应用的数目。

[0387] 在一些背景下,可能需要防止刺激因子(例如,淋巴因子或细胞因子)的过表达可能潜在地导致受试者中不希望的结果或较低的疗效(例如受试者中与毒性相关的因素)的可能性。因此,在一些情境下,经工程化的细胞包括导致所述细胞在体内(如在过继免疫疗法中给予时)对阴性选择易感的基因区段。例如,在一些方面,将细胞工程化,使得它们可以由于给予它们的患者的体内状况的改变而被消除。阴性选择性表型可以由赋予对所给予的药剂(例如,化合物)的敏感性的基因的插入而产生。阴性选择性基因包括单纯疱疹病毒I型

胸苷激酶 (HSV-I TK) 基因 (Wigler等人, Cell 2:223, 1977), 其赋予更昔洛韦敏感性; 细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT) 基因; 细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶 (APRT) 基因; 细菌胞嘧啶脱氨酶 (Mullen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992))。

[0388] 在一些实施方案中, 使用重组感染性病毒粒子 (例如像源自猿猴病毒40 (SV40)、腺病毒、腺相关病毒 (AAV) 的载体) 将重组核酸转移至细胞中。在一些实施方案中, 使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体 (如  $\gamma$ -逆转录病毒载体) 将重组核酸转移到T细胞中 (参见例如, Koste等人 (2014) Gene Therapy 2014年4月3日. doi:10.1038/gt.2014.25; Carlens等人 (2000) Exp Hematol 28 (10):1137-46; Alonso-Camino等人 (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park等人, Trends Biotechnol. 2011年11月29日 (11):550-557。

[0389] 在一些实施方案中, 所述逆转录病毒载体具有长末端重复序列 (LTR), 例如源自莫洛尼鼠白血病病毒 (MoMLV)、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) 或腺相关病毒 (AAV) 的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体衍生自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中, 所述逆转录病毒包括源自任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。所述逆转录病毒通常是双嗜性的, 这意味着它们能够感染包括人在内的若干种物种的宿主细胞。在一个实施方案中, 待表达的基因替代逆转录病毒 gag、pol 和/或 env 序列。已经描述了许多说明性逆转录病毒系统 (例如, 美国专利号 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller 和 Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A.D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa 等人 (1991) Virology 180:849-852; Burns 等人 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; 以及 Boris-Lawrie 和 Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109。

[0390] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如 Wang 等人 (2012) J. Immunother. 35 (9):689-701; Cooper 等人 (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeven 等人 (2009) Methods Mol Biol. 506:97-114; 以及 Cavalieri 等人 (2003) Blood. 102 (2):497-505 中。

[0391] 在一些实施方案中, 经由电穿孔将重组核酸转移到T细胞中 (参见例如, Chicaybam 等人, (2013) PLoS ONE 8 (3):e60298 和 Van Tedeloo 等人 (2000) Gene Therapy 7 (16):1431-1437)。在一些实施方案中, 经由转座将重组核酸转移到T细胞中 (参见例如, Manuri 等人 (2010) Hum Gene Ther 21 (4):427-437; Sharma 等人 (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; 以及 Huang 等人 (2009) Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其他方法包括磷酸钙转染 (例如, 如在 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y. 中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染; 钨粒子促进的微粒轰击 (Johnston, Nature, 346:776-777 (1990)); 以及磷酸锆DNA共沉淀 (Brash 等人, Mol. Cell Biol., 7:2031-2034 (1987))。

[0392] 用于转移编码所述重组产物的核酸的其他方法和载体是例如在国际专利申请公开号 WO 2014055668 和美国专利号 7,446,190 中所述的那些。

[0393] 在一些实施方案中, 细胞 (例如, T细胞) 可以在扩增期间或之后例如用细胞表面缀合物、T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR) 进行转染。例如, 这种用于引入所需多肽或受体的基因的转染可以用任何合适的逆转录病毒载体进行。然后可以使遗传修饰的细胞群摆脱初始刺激物 (例如 CD3/CD28 刺激物), 并随后用第二种类型的刺激物例如经由从头引入的

受体进行刺激。所述第二种类型的刺激物可包括肽/MHC分子形式的抗原刺激物、遗传引入的受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然配体)或在新受体的框架内直接结合(例如通过识别受体内的恒定区)的任何配体(如抗体)。参见例如,Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”*Methods Mol Biol.*2012;907:645-66;或Barrett等人,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer *Annual Review of Medicine*第65卷:333-347(2014)。

[0394] 另外的核酸(例如,用于引入的基因)包括用于改善治疗功效的那些,如通过促进转移细胞的活力和/或功能;用于提供选择和/或评估细胞的遗传标记的基因,如以评估体内存活或定位;改善安全性的基因,例如通过使细胞在体内对阴性选择易感,如Lupton S.D.等人,*Mol. and Cell Biol.*,11:6(1991)和Riddell等人,*Human Gene Therapy* 3:319-338(1992)所述;还参见Lupton等人的PCT/US 91/08442和PCT/US 94/05601的出版物,其描述了使用由将显性阳性选择性标记与阴性选择性标记融合而得到的双功能选择性融合基因。参见例如,Riddell等人,美国专利号6,040,177,第14-17栏。

[0395] 在一些实施方案中,在基因工程化之前或与其相连地孵育和/或培养细胞。所述孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。孵育和/或工程化可以在培养容器中进行,所述培养容器是如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或其他用于培养或培育细胞的容器。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂的存在下孵育所述组合物或细胞。这些条件包括针对以下而设计的那些条件:用于诱导群体中细胞的增殖、扩增、激活和/或存活的条件,用于模拟抗原暴露和/或用于引发细胞进行基因工程化,如以引入重组抗原受体。

[0396] 条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0397] 在一些实施方案中,刺激条件或药剂包括一种或多种药剂(例如配体),其能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在一些方面,所述药剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可包括抗体如对于TCR具有特异性的抗体,例如抗CD3。在一些实施方案中,刺激条件包括一种或多种药剂例如配体,其能够刺激共刺激受体,例如抗CD28。在一些实施方案中,这种药剂和/或配体可结合至固体支撑物如珠和/或一种或多种细胞因子。任选地,所述扩增方法还可以包括向培养基中(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤。在一些实施方案中,所述刺激剂包括IL-2、IL-15和/或IL-7。在一些方面,IL-2浓度为至少约10单位/mL。

[0398] 在一些方面,孵育是根据多种技术来进行,例如以下文献中所述的那些技术:授予Riddell等人的美国专利号6,040,177;Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35(9):651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 1:72-82;和/或Wang等人(2012) *J Immunother.* 35(9):689-701。

[0399] 在一些实施方案中,通过以下方法扩增T细胞:向培养起始组合物中加入饲养细胞(如非分裂外周血单核细胞(PBMC)) (例如,使得所得细胞群含有至少约5、10、20或40种或更多种PBMC饲养细胞,以使初始群体中的每种T淋巴细胞进行扩增);以及孵育培养物(例如,持续足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面,非分裂饲养细胞可包含 $\gamma$ 辐射的PBMC饲养

细胞。在一些实施方案中,用约3000至3600拉德范围内的 $\gamma$ 射线照射PBMC以防止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群之前将饲养细胞加入到培养基中。

[0400] 在一些实施方案中,所述刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,通常为至少约30摄氏度,并且通常在或约在37摄氏度。任选地,所述孵育还可以包括添加非分裂EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用在约6000至10,000拉德范围内的 $\gamma$ 射线照射LCL。在一些方面,所述LCL饲养细胞以任何合适的量(如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1)提供。

[0401] 在一些实施方案中,所述制备方法包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)所述细胞的步骤。在一些实施方案中,所述冷冻和后续解冻步骤去除所述细胞群中的粒细胞,并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤之后将所述细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个例子涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻培养基。然后将其用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后通常将细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80°C并储存在液氮储罐的气相中。

[0402] IV. 选择或检测转导细胞的方法

[0403] 提供了结合制造(例如制备和加工)基因工程化的细胞靶向细胞表面缀合物的药剂(例如亲和标签,如Strep-标签)的方法。在一些实施方案中,将含有细胞表面分子和至少一种药剂的细胞表面缀合物用于检测用细胞表面缀合物转导的细胞。在另外的实施方案中,细胞检测用细胞表面缀合物转导的细胞之后是分离和鉴定用细胞表面缀合物转导的细胞。

[0404] 在一些方面,提供了在将细胞工程化的方法的基因转移、细胞加工、孵育、培养和/或配制步骤的一个或多个步骤之前、期间或之后(例如在如上所述的任何处理步骤期间)检测、选择或分离基因修饰的细胞的方法。在一些方面,在基因修饰的细胞(例如T细胞)的生产和进一步加工期间,仅明确选择并进一步加工对转基因呈阳性的那些细胞是有意义的。在所提供的方法中,通过检测细胞表面缀合物的药剂(例如肽)(如亲和标签),例如通过检测链霉亲和素结合蛋白(例如Strep-标签)来进行基因修饰的细胞的检测和选择。在一些方面,细胞表面缀合物的检测是与细胞表面缀合物共同引入和/或共表达的重组受体的替代标记。

[0405] 在一些方面,含有用于检测的细胞的组合物包括由一个或多个加工步骤(例如分离、离心、基因工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)产生的样品。在一些实施方案中,将细胞或细胞的组合物与对所述缀合物的药剂具特异性的结合分子接触,所述细胞或细胞的组合物在将细胞工程化的方法的基因转移(例如用病毒载体转导)、细胞加工、孵育、培养、洗涤和/或配制步骤中的一个或多个步骤(例如本文描述的任何步骤)之前、期间或之后获得。在某些实施方案中,接触是在允许结合分子与组合物的细胞中存在的细胞表面缀合物的药剂结合的条件下进行的。在某些实施方案中,所述方法进一步包括检测在结合分子与样品中缀合物的药剂之间是否形成复合物,和/或检测这种结合的存在或不存在或水平。在一些实施方案中,结合分子是可检测地标记的,例如用荧光部分标记的。

[0406] 在所提供方法的一些方面,使用能够特异性结合细胞表面缀合物的药剂(例如肽)



(如亲和标签)的抗体或抗原结合片段进行检测。可以使用针对细胞表面缀合物的亲和标签的任何已知抗体或抗原结合片段,例如如上所述的任何抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,细胞表面缀合物含有如所描述的链霉亲和素结合肽,例如Strep-标签(例如Strep-标签® II或双-strep标签),并且所述抗体或抗原结合片段特异性结合链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,所述抗体是可检测地标记的,例如荧光标记的。

[0407] 在所提供方法的一些方面,使用非抗体结合分子试剂进行检测。在一些实施方案中,细胞表面缀合物含有如所描述的链霉亲和素结合肽,例如Strep-标签(例如Strep-标签® II或双-strep标签),并且所述试剂是或包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白、或者链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的寡聚物。在一些实施方案中,结合分子试剂是或包含SEQ ID NO:3、4、5、6、27或28中任一个中所示的链霉亲和素突变蛋白,或者是链霉亲和素突变蛋白的寡聚物。在一些实施方案中,结合分子试剂是可商购获得的试剂,称为Strep-Tactin®或Strep-Tactin® XT。在一些实施方案中,非抗体结合分子试剂是可检测地标记的,例如荧光标记的。

[0408] 在一些实施方案中,结合分子可以用于鉴定、分选、富集或分离表达本公开文本的细胞表面缀合物的细胞,例如用于分离对细胞表面缀合物(例如ST-EGFRt或ST-PSMA)呈阳性的并且因此对重组受体也呈阳性的基因修饰的细胞。在一些实施方案中,所提供的方法包括使在基因转移(例如,用病毒载体转导)、洗涤、细胞加工、孵育、培养和/或配制步骤中的一个或多个步骤之前、期间或之后获得的细胞或细胞的组合物与对缀合物的药剂具特异性的结合分子接触,并且选择或分离对结合分子的结合呈阳性的细胞。在一些实施方案中,结合分子是特异性结合所述药剂的抗体或抗原结合片段(例如,抗药剂抗体,如抗Strep-标签® 抗体)。在一些实施方案中,结合分子是特异性结合所述药剂的非抗体蛋白质试剂(例如,与Strep-标签结合的Strep-Tactin®)。在一些方面,可以使用基质,例如磁珠、琼脂糖颗粒、细胞培养皿或其他固体表面基质,其中已经固定、缀合或结合了对所述缀合物的药剂具特异性的(例如对亲和标签具特异性的)结合分子。在一些实施方案中,所述试剂被包含在支撑物,如固体支撑物或表面,例如珠、或固定相(色谱基质)上。在某些实施方案中,使用磁珠或基于顺磁珠的分离或通过使用亲和柱对此类细胞进行分选、富集或分离。

[0409] 在一些实施方案中,对所述药剂具特异性的结合分子(如任何抗体或非抗体试剂(例如链霉亲和素突变蛋白,如Strept-tactin))被包含在支撑物,如固体支撑物或表面,例如珠、或固定相(色谱基质)上。在一些此类实施方案中,所述试剂被可逆地固定在支撑物上。在一些情况下,所述试剂经由共价键被固定在支撑物上。在一些方面,所述试剂被非共价地可逆地固定在支撑物上。

[0410] 在一些实施方案中,所述支撑物是固体支撑物。可以将任何固体支撑物(表面)用于固定结合分子,包括抗体或非抗体试剂。其上可以固定结合分子的固体支撑物的说明性例子包括磁珠、聚合物珠、细胞培养板、微量滴定板、膜或中空纤维。在一些方面,中空纤维可以用作Quantum®细胞扩增系统(可获自TerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA))中的生物反应器。在一些实施方案中,结合分子共价地附接到固体支撑物上。在其他实施方案中,非共价相互作用也可以用于固定,例如在塑料基底上。



[0411] 在一些实施方案中,结合分子可以是例如包含结合所描述的链霉亲和素结合肽的链霉亲和素或抗生物素蛋白突变蛋白的非抗体试剂。此类链霉亲和素突变蛋白可以共价地附接到任何表面(例如,用于色谱纯化的树脂(珠))上,并且可以以例如Strep-Tactin®琼脂糖凝胶、Strep-Tactin® Superflow®、Strep-Tactin® Superflow® 大容量、或Strep-Tactin® MacroPrep®等形式从IBA GmbH, Göttingen商购获得。

[0412] 容易商购获得的其他说明性例子是固定化金属亲和色谱(IMAC)树脂,如TALON®树脂(Westburg, Leusden, The Netherlands),其可以用于固定寡聚组氨酸标记的(his-标记的)蛋白质,例如用于结合诸如五组氨酸或六组氨酸标签等寡聚组氨酸标签。其他例子包括可获自GE Life Sciences的钙调蛋白琼脂糖凝胶,其可以用于结合其中药剂(亲和标签)是钙调蛋白结合肽的缀合物。另外的例子包括与谷胱甘肽偶联的琼脂糖凝胶,其可以用于结合其中药剂(亲和标签)是谷胱甘肽-S-转移酶的缀合物。

[0413] 在一些实施方案中,本发明方法中使用的固体支撑物可以包括磁性可吸引物质如一种或多种磁性可吸引颗粒或铁磁流体。相应的磁性可吸引颗粒可以包含具有能够结合靶细胞的结合位点的试剂。在一些情况下,磁性可吸引颗粒可以含有反磁性、铁磁性、顺磁性或超顺磁性材料。通常,超顺磁性材料响应于具有感应磁场而不会产生永久磁化的磁场。基于氧化铁磁性颗粒例如可以以Dynabeads®从DynaL Biotech、以磁性MicroBeads从Miltenyi Biotec、以磁性多孔玻璃珠从CPG Inc.、以及从各种其他来源(如Roche Applied Science、BIOCLON、BioSource International Inc.、micromod、AMBION、Merck、Bangs Laboratories、Polysciences、or Novagen Inc.,仅举几例)商购获得。例如Hutten, A.等人(J. Biotech. (2004), 112, 47-63)已经描述了基于超顺磁性Co和FeCo的磁性纳米颗粒,以及铁磁性Co纳米晶体。在一些实施方案中,使用免疫磁性(或亲和磁性)分开技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于Methods in Molecular Medicine,第58卷:Metastasis Research Protocols,第2卷:Cell Behavior In Vitro and In Vivo,第17-25页S.A. Brooks和U. Schumacher编辑©Humana Press Inc.,新泽西州托托瓦)。

[0414] 在一些实施方案中,所述支撑物含有固定相。因此,在一些实施方案中,结合分子被包含在固定相(也称为色谱基质)上。在一些此类实施方案中,结合分子被可逆地固定在固定相上。在一些情况下,结合分子经由共价键被可逆地固定在固定相上。在一些方面,结合分子被非共价地可逆地固定在固定相上。

[0415] 可以使用任何材料作为色谱基质。通常,合适的色谱材料是基本上无害的,即对细胞活力无害,例如当在所希望条件下用于填充色谱柱时。在一些实施方案中,固定相保持在预定位置,例如预定方向,然而样品的位置是改变的。因此,在一些实施方案中,固定相是流动相流过(通过流过或以分批模式流动)并且出现在液相中包含的组分在各相之间分布(溶解或分散)的色谱系统的一部分。

[0416] 在一些实施方案中,色谱基质具有固体相或半固体相的形式,然而含有待分离/分开的靶细胞的样品是流体相。色谱基质可以是颗粒材料(具有任何合适的大小和形状)或单片色谱材料,包括纸基底或膜。因此,在一些方面,色谱可以是柱色谱以及平面色谱。在一些实施方案中,除了标准色谱柱之外,允许双向流动的柱(如可获自PhyNexus, Inc. San Jose,

CA, U.S.A. 的 **PhyTip®** 柱)、或微量移液枪头可以用于基于柱/基于流过模式的方法。因此, 在一些情况下, 可用于本发明方法中的色谱柱也包含微量移液枪头或允许双向流动的柱。在一些情况下, 例如在使用颗粒基质材料的情况下, 颗粒基质材料可以例如具有约 5 $\mu\text{m}$  至约 200 $\mu\text{m}$ 、或从约 5 $\mu\text{m}$  至约 400 $\mu\text{m}$ 、或从约 5 $\mu\text{m}$  至约 600 $\mu\text{m}$  的平均粒度。在一些方面, 色谱基质可以是例如是或包括聚合物树脂或金属氧化物或非金属氧化物。在一些方面, 例如在使用平面色谱的情况下, 基质材料可以是适合用于平面色谱的任何材料, 例如基于常规纤维素的或基于有机聚合物的膜 (例如, 纸膜、硝酸纤维素膜或聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜) 或二氧化硅涂覆的玻璃板。在一个实施方案中, 色谱基质/固定相是非磁性材料或不可磁化材料。在其他实施方案中, 本发明方法中使用的色谱基质没有任何磁性可吸引物质。

[0417] 在一些实施方案中, 适合于本发明方法的非磁性或不可磁化色谱固定相包括衍生化二氧化硅或交联凝胶。在一些方面, 交联凝胶可以是基于天然聚合物, 例如基于在自然界中存在的聚合物类别。例如, 色谱固定相可以基于的天然聚合物是多糖。在一些情况下, 相应的多糖通常是交联的。多糖基质的例子包括但不限于琼脂糖凝胶 (例如, 可以以不同的珠尺寸和孔径商购获得的 **Superflow™** 琼脂糖或 **Sepharose®** 材料如 **Superflow™** **Sepharose®**) 或交联葡聚糖的凝胶。另外的说明性例子是可商购获得 (以各种珠尺寸和具有各种孔径) 的葡聚糖共价键合的颗粒状交联琼脂糖基质, 如 **Sephadex®** 或 **Superdex®**, 两者均可获自 GE Healthcare。这样的色谱材料的另一个说明性例子是 **Sephacryl®**, 其也可以不同的珠尺寸和孔径从 GE Healthcare 获得。

[0418] 在一些实施方案中, 交联凝胶也可以基于合成聚合物, 例如基于在自然界中不存在的聚合物类别。在一些方面, 色谱固定相基于的这样的合成聚合物是具有极性单体单元的聚合物, 并且因此其本身是极性的。因此, 在一些情况下, 这样的极性聚合物是亲水性的。在一些方面, 亲水性分子 (也称为疏脂性) 含有可以与水分子形成偶极-偶极相互作用的部分。通常, 疏水性分子 (也称为亲脂性) 具有与水分离的倾向。

[0419] 合适的合成聚合物的说明性例子是聚丙烯酰胺、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶、以及丙烯酸酯和二醇的共聚物或丙烯酰胺和二醇的共聚物。说明性例子是聚甲基丙烯酸酯凝胶, 可作为 **Fractogel®** 商购获得。另外的例子是乙二醇和甲基丙烯酸酯的共聚物, 可作为 **Toyopearl®** 商购获得。在一些实施方案中, 色谱固定相还可以包括天然和合成的聚合物组分, 例如复合基质、或多糖和琼脂糖的复合物或共聚物 (例如聚丙烯酰胺/琼脂糖复合物)、或多糖和 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺的复合物或共聚物。葡聚糖和 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物的说明性例子是上述 **Sephacryl®** 系列的材料。在一些实施方案中, 衍生化二氧化硅可以包括与合成或天然聚合物偶联的二氧化硅颗粒。此类实施方案的例子包括但不限于多糖枝接的二氧化硅、聚乙烯吡咯烷酮枝接的二氧化硅、聚环氧乙烷枝接的二氧化硅、聚(2-羟基乙基天冬酰胺) 二氧化硅和聚(N-异丙基丙烯酰胺) 枝接的二氧化硅。

[0420] 在一些实施方案中, 可以通过使所述固体支撑物 (例如基质) 与含有如所描述进行富集或选择的细胞的样品接触而将固体支撑物 (如珠或色谱基质) 用于如本文描述的富集和选择方法中。在一些实施方案中, 通过破坏结合分子与药剂 (例如亲和标签) 的相互作用, 从固体支撑物 (例如基质) 中洗脱或释放所选择的细胞。

[0421] 在一些实施方案中,结合分子与细胞表面缀合物的药剂的结合是可逆的。在一些实施方案中,通过使细胞与包含能够逆转结合分子与药剂之间的键的物质的组合物接触来实现破坏结合分子与药剂的可逆结合。例如,所述物质是游离结合配偶体和/或是竞争剂(例如生物素、生物素类似物、其生物活性片段)。在一些实施方案中,所述方法包括在将样品中的细胞与含有与其结合的结合分子的固体支撑物接触之后,应用竞争物质以破坏在缀合物的药剂(例如亲和标签)与结合分子之间的键,从而从固体表面回收所选择的细胞。上面描述了用于在所提供的方法中使用的示例性竞争物质,并且竞争物质的选择取决于特定的药剂和结合分子。在一些实施方案中,结合分子是用于识别链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签)药剂的链霉亲和素突变蛋白(例如Strep-Tactin),并且竞争物质是生物素或生物素类似物。

[0422] 在所提供的实施方案中,在制造过程中使用结合分子(例如链霉亲和素突变蛋白试剂,如Strep-Tactin)和细胞表面缀合物的药剂(例如Strep-标签)之间的可逆结合对转导细胞的选择优于使用对细胞表面缀合物具有更高亲和力的抗体,所述抗体可能保持附着于给予至受试者的产品中的细胞上。在一些实施方案中,使用Strep-Tactin®作为试剂。在一些实施方案中,用所述试剂检测细胞表面缀合物的药剂部分是可逆的,并且向样品中添加生物素可以温和地释放转导的细胞。

[0423] 在一些方面,可以实现可逆性,因为链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签)与链霉亲和素突变蛋白结合试剂之间的键是高的,但是小于链霉亲和素结合试剂对生物素或生物素类似物的结合亲和力。因此,在一些实施方案中,可以添加生物素(维生素H)或生物素类似物以竞争结合来破坏在固体支撑物(例如珠或色谱基质)上的链霉亲和素突变蛋白结合试剂与缀合物的链霉亲和素结合肽(例如Strep标签)之间的结合相互作用。在一些实施方案中,可以在低浓度的生物素或类似物的存在下(例如在0.1mM至10mM、0.5mM至5mM、或1mM至3mM的存在下,例如通常至少或至少约1mM或至少2mM,例如为或约2.5mM)逆转相互作用。在一些实施方案中,在竞争剂(如生物素或生物素类似物)的存在下孵育从固体支撑物(如色谱基质或珠)释放所选择的细胞。

[0424] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在组分的可逆解离之后分离或去除剩余的一种或多种组分。在一些实施方案中,可以分离或去除靶细胞(例如基因修饰的,如转导的,T细胞)中的任何未结合或残留的生物素。在一些实施方案中,从靶细胞组合物中的细胞中去除或分离结合分子试剂。在一些实施方案中,由于可逆结合的结合分子(例如含有链霉亲和素突变蛋白的试剂,如Strep-Tactin试剂)从细胞表面缀合物的解离,所提供的方法具有额外的优点,即在接触或孵育期结束时分离的细胞不含结合分子。在一些实施方案中,含有靶细胞的组合物不含任何反应物,这在一些方面有利于与诊断应用(例如,进一步的FACS™分选)结合使用或有利于任何基于细胞的治疗应用。

[0425] 在一些实施方案中,可以使用第二固定相进行结合分子的分离/去除。出于这一目的,在应用到上面描述的第一固定相之前或之后,将包含靶细胞和一种或多种剩余组分的混合物暴露于在合适的第二固定相上的色谱。这种第二固定相可以是凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中所述凝胶过滤和/或亲和色谱基质包含亲和试剂。包含在色谱树脂上的亲和试剂包括结合配偶体D,所述结合配偶体D(特异性地)与结合分子试剂(例如链霉亲和素突变蛋白,如Strep-Tactin)的结合位点Z结合,从而将结合分子试剂固定在固定相上。如

果使用基于链霉亲和素的结合分子试剂(如Strep-Tactin)并且缀合物的药剂是或包含链霉亲和素结合肽(例如Strep-标签),则在这种第二固定相的亲试剂中包含的结合配偶体D可以是生物素。然后,组合物中任何剩余的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白与生物素结合,所述生物素通常与可商购获得的色谱基质(如biotin-sepharose™)共价偶联。在一些此类实施方案中,靶细胞(例如基因修饰的,如转导的,T细胞)可以从结合分子试剂中回收。

[0426] 在一些实施方案中,用于破坏或逆转药剂与结合分子之间的结合的竞争物质可以经由“去除筒”容易地从刺激的细胞群中去除(参见例如,在国际专利申请W0 2013/124474中所描述的)。在一些情况下,例如其中结合分子被固定在固体支撑物(如生物反应器表面或磁珠)上,所述结合分子被抑制。因此,使用去除筒用于去除游离药剂和竞争试剂,可以包括将洗脱样品(例如在破坏可逆结合之后获得的样品)加载到第二色谱柱上。在一些实施方案中,这种色谱柱具有合适的固定相,所述固定相既是亲和色谱基质又同时可以充当凝胶渗透基质。在一些方面,这种亲和色谱基质具有固定在其上的亲和试剂。在一些实施方案中,亲和试剂可以是例如链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或其混合物。

[0427] 在一些实施方案中,色谱基质是凝胶过滤基质,例如,当用于如本文描述的去筒中时。通常,凝胶过滤的特征在于其被设计以经历的特性。因此,在一些方面,凝胶过滤基质允许在很大程度上基于它们的尺寸分离细胞或其他生物实体。在一些此类方面,相应的色谱基质通常是如上所述的颗粒状多孔材料。色谱基质可以具有一定的排阻极限,其通常依据分子量来定义,高于所述分子量时分子完全被排除不能进入孔中。在一些实施方案中,可以将限定尺寸排阻极限的相应分子量选择为低于与靶细胞重量对应的重量。在这样的实施方案中,阻止了靶细胞进入尺寸排阻色谱基质的孔中。同样地,固定相可以具有尺寸小于所选靶细胞的尺寸的孔。在说明性实施方案中,色谱基质的平均孔径为0至约500nm。

[0428] 在一些实施方案中,存在于样品中的组分(如竞争物质)可以具有低于孔的排阻极限的尺寸,并且因此可以进入色谱基质的孔中。在一些方面,在能够部分或完全进入孔体积的此类组分中,较少进入孔体积的较大分子可以首先洗脱,然而最小的分子通常最后洗脱。在一些实施方案中,将色谱基质的排阻极限选择为低于靶细胞的最大宽度。因此,在一些方面,可进入孔体积的组分可以在色谱基质中/上保持比靶细胞更长的时间。因此,在一些情况下,靶细胞可以与样品的其他物质/组分分离地收集在色谱柱的洗脱液中。因此,在一些方面,诸如竞争物质等组分可以在比靶细胞稍后的时间点从凝胶过滤基质中洗脱。在一些实施方案中,可以进一步增加这种效果,例如如果凝胶渗透基质含有亲和试剂(如共价结合于其上),所述亲和试剂含有能够结合样品中存在的竞争物质的结合位点Z。在一些情况下,竞争物质可以被试剂的结合位点Z结合,并且从而被固定在基质上。在一些方面,这种方法在去除筒中实施。

[0429] 在一些实施方案中,提供了装置,所述装置包含第一固定相和第二固定相(例如用于选择靶细胞的色谱柱(选择筒)和用于去除试剂的第二色谱柱(去除筒))的至少一种布置。所述装置可以包含串联流体连接的第一固定相和第二固定相(色谱柱)的多种布置。所述装置可以包含样品入口,所述样品入口与第一固定相和第二固定相的第一布置的第一固定相流体连接。在一些实施方案中,所述装置还可以包含用于细胞的样品出口,所述样品出口与用于色谱法的第一固定相和第二固定相的至少一种布置的最后一种的第二固定相流

体连接。在一些方面,所述装置还可以包含竞争试剂容器,所述竞争试剂容器与第一固定相和第二固定相的布置的至少一个第一固定相流体连接。

[0430] 在一些实施方案中,从组合物中去除试剂和其他组分的能力具有另外的优点:即能够避免任何固体支撑物如磁珠。在一些实施方案中,这意味着没有靶细胞(例如基因修饰的,如转导的,T细胞)被此类磁珠污染的风险或具有靶细胞(例如基因修饰的,如转导的,T细胞)被此类磁珠污染的最小风险。在一些实施方案中,这也意味着与其他方法相比,可以更容易地建立符合GMP标准的过程,例如使用**Dynabeads®**,其中必须采取额外措施以确保最终的T细胞群不含磁珠。

[0431] 在一些实施方案中,由于不存在固相(例如磁珠),本发明还提供用于细胞扩增的自动闭合系统,所述自动关闭系统可以整合到已知的细胞扩增系统中,所述细胞扩增系统例如为可获自GE Healthcare (HYPERLINK“[http://en.wikipedia.org/wiki/Little\\_Chalfont](http://en.wikipedia.org/wiki/Little_Chalfont)”\o“Little Chalfont”Little Chalfont,Buckinghamshire,United Kingdom)的Xuri细胞扩增系统W25和WAVE生物反应器2/10系统、或可获自TerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA)的**Quantum®**细胞扩增系统。

[0432] 在一些实施方案中,所述关闭系统是自动化的。在一些实施方案中,与所述系统相关联的组件可以包括集成微型计算机、蠕动泵和各种阀(如夹管阀或旋塞阀),以控制所述系统的各个部件之间的流体流动。在一些方面,所述集成计算机控制所述仪器的所有部件并指示所述系统以标准化顺序执行重复程序。在一些实施方案中,所述蠕动泵控制整个管组的流速,并与夹管阀一起确保缓冲液通过所述系统的受控流动。

[0433] 在一些实施方案中,实施所述方法以基于对缀合物的药剂(例如亲和和标签)(如链霉亲和素结合肽)的检测来选择、分离或富集表达细胞表面缀合物的细胞。在一些方面,分离的、富集的或选择的细胞代表已经例如通过转导用编码细胞表面缀合物和任选地共表达的重组受体(如CAR)的核酸分子基因工程化的细胞。在一些实施方案中,所提供的方法产生或导致含有如下细胞的细胞组合物,所述细胞富集表达细胞表面缀合物的细胞,并且因此还富集表达重组受体的细胞。

[0434] 在一些实施方案中,在富集的组合物中的表达细胞表面缀合物的细胞的产量,即与起始样品中同一细胞群的数量相比在群体中富集细胞的数量,是10%至100%,如20%至80%、20%至60%、20%至40%、40%至80%、40%至60%、或60%至80%。

[0435] 在一些实施方案中,在富集或分离的组合物中的表达细胞表面缀合物的细胞的百分比,即对所选择的细胞表面缀合物呈阳性的细胞与富集或分离细胞群体中的总细胞的百分比,是至少或至少约70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%,并且通常是至少或至少约95%、96%、97%、98%、99%或更高。

[0436] V. 组合物和配制品

[0437] 提供了用于给予的组合物,所述组合物包括细胞,如含有细胞表面缀合物和/或另外的重组受体(例如CAR)的工程化细胞。在一些方面,药物组合物和配制品作为单位剂型组合物提供,所述单位剂型组合物包括用于以给定剂量或其部分给予的细胞数量。药物组合物和配制品通常包括一种或多种任选的药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,所述组合物包括至少一种另外的治疗剂。

[0438] 术语“药物配制品”是指这样的制剂,其处于使得其中所含活性成分的生物活性有

效的形式,并且不含对给予配制品的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0439] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除了活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0440] 在一些方面,载体的选择部分取决于特定细胞和/或给予方法。因此,存在多种合适的制剂。例如,所述药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,使用两种或更多种防腐剂的混合物。所述防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。载体描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980)。药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0441] 在一些方面,在所述组合物中包括缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。所述缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可给予的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins;第21版(2005年5月1日)中。

[0442] 所述配制品或组合物还可含有可用于用细胞治疗的特定适应症、疾病或病症的多于一种活性成分,优选具有与所述细胞互补的活性的那些成分,其中各自的活性不会相互产生不利影响。此类活性成分以有效用于既定目的量以合适的方式组合存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物进一步包含其他药物活性剂或药物如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。在一些实施方案中,所述细胞或抗体以盐(例如药学上可接受的盐)的形式给予。合适的药学上可接受的酸加成盐包括源自无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸,硝酸和硫酸)和有机酸(如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸和芳基磺酸,例如对甲苯磺酸)的那些盐。

[0443] 可以将活性成分包埋在微胶囊、胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中。在某些实施方案中,将所述药物组合物配制为包合物(如环糊精包合物)或配制成脂质体。脂质体可以用于将所述宿主细胞(例如,T细胞或NK细胞)靶向特定组织。许多方法可用于制备脂质体,例如在例如Szoka等人,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.,9:467(1980),以及美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369中描述的那些。

[0444] 在一些方面,所述药物组合物可以利用定时释放、延迟释放和持续释放递送系统,

使得所述组合物的递送发生在待治疗部位的致敏之前并且有足够的时间引起致敏。许多类型的释放递送系统是可行的并且是已知的。此类系统可以避免重复给予所述组合物,从而增加对受试者和医师的便利性。

[0445] 在一些实施方案中,药物组合物包含有效治疗或预防疾病或病症的量(例如治疗有效量或预防有效量)的工程化细胞。在一些实施方案中,通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复给予,取决于病症,重复所述治疗直至出现所需疾病症状的抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。所需剂量可以通过单次推注给予所述组合物、通过多次推注给予所述组合物或通过连续输注给予所述组合物来递送。

[0446] 药物组合物,例如含有工程化细胞的那些药物组合物,可以使用标准给予技术、配制品和/或设备进行给予。提供了用于储存和给予所述组合物的配制品和设备(如注射器和小瓶)。所述工程化细胞的给予可以是自体的或异源的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可以获得自一名受试者,并且给予至同一受试者或不同的相容受试者。外周血衍生的免疫应答细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生的)可以经由局部注射给予,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给药。在给予治疗性组合物(例如,含有遗传修饰的免疫应答细胞的药物组合物)时,通常将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0447] 配制品包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、透皮、肌肉、鼻内、经颊、舌下或栓剂给予的那些。在一些实施方案中,肠胃外给予所述细胞群。如本文所用术语“肠胃外”包括静脉内、肌肉、皮下、直肠、阴道和腹膜内给予。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送将所述细胞群给予受试者。

[0448] 在一些实施方案中,组合物作为无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物,其在一些方面可以缓冲至选择的pH。液体制剂一般比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物制备起来更容易。另外地,液体组合物稍微更方便给予,特别是通过注射。在另一方面,粘性组合物可以配制在适当的黏度范围内,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,其可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0449] 无菌可注射溶液可以通过将细胞掺入溶剂中来制备,例如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)掺合。所述组合物也可以是冻干的。所述组合物可以含有辅助物质,如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、颜料等,这取决于给予途径和所需的制剂。在一些方面,可以参考标准文本来制备合适的制剂。

[0450] 可以加入各种增强组合物稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。防止微生物的作用可以通过不同的抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸等)来确保。通过使用延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0451] 可以制备缓释制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质呈成型制品(例如薄膜)或微胶囊的形式。

[0452] 用于体内给予的制剂通常是无菌的。可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无



菌。

[0453] VI. 给予和治疗方法及相关方法

[0454] 还提供了在治疗疾病、病症和障碍(其中表达由重组受体(例如CAR)识别的抗原)中使用所述分子和组合物(例如含有工程化细胞)的方法,以及所述分子和组合物在治疗疾病、病症和障碍(其中表达由重组受体(例如CAR)识别的抗原)中的用途。还提供了通过识别由工程化细胞表达的细胞表面缀合物来鉴定、检测或选择所述分子和组合物(例如含有工程化细胞)的方法和用途。在一些实施方案中,此类方法包括诊断和预后方法,以及在一些情况下,工程化细胞的自杀或删减方法。此类方法包括监测给予的工程化细胞的方法和调节工程化细胞的方法,例如结合过继细胞疗法。

[0455] 在一些实施方案中,将含有细胞表面分子和至少一种药剂的细胞表面缀合物用于检测用细胞表面缀合物转导的细胞。在一些实施方案中,所述检测是在体内或离体的。在一些实施方案中,将细胞表面受体缀合物用于靶向工程化细胞以自杀杀伤工程化细胞。在一些方面,杀伤被转导以表达细胞表面缀合物的细胞使用对所表达的细胞表面缀合物的细胞表面分子具特异性的结合分子。在其他方面,提供了通过使用如下分子靶向细胞表面缀合物的药剂来杀伤细胞的方法,所述分子包含对与细胞毒性剂(如毒素)连接的缀合物的药剂具特异性的结合分子。

[0456] A. 过继细胞疗法方法

[0457] 提供了给予工程化细胞和组合物的方法,以及此类工程化细胞和组合物用于治疗或预防疾病、病症和障碍(包括癌症)的用途。在一些实施方案中,将工程化细胞和组合物给予至受试者或患者,所述受试者或患者患有要例如经由过继细胞疗法(如过继T细胞疗法)治疗的特定疾病或病症。在一些实施方案中,将所提供的细胞或组合物给予至受试者,如患有或有风险患上所述疾病或病症的受试者。在一些方面,所述方法由此治疗疾病或病症(例如,改善其一种或多种症状),例如通过减轻表达由工程化T细胞识别的抗原的癌症中的肿瘤负荷来治疗。

[0458] 用于过继细胞疗法的工程化细胞的给予方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继T细胞治疗方法描述于例如Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85。参见例如,Themeli等人(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。

[0459] 如本文所用,“受试者”是哺乳动物,如人或其他动物,并且通常是人。在一些实施方案中,向其给予免疫调节多肽、工程化细胞或组合物的受试者(例如,患者)是哺乳动物,通常是灵长类动物,如人。在一些实施方案中,所述灵长类动物是猴或猿。所述受试者可以是雄性或雌性,并且可以处于任何合适的年龄,包括婴儿、幼年、青春期、成年和老年受试者。在一些实施方案中,所述受试者是非灵长类哺乳动物,如啮齿动物。

[0460] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变体如“治疗”(“treat”或“treating”))是指疾病或病症或障碍、或者与之相关的症状、不良效果或结果或表型的完全或部分改善或减轻。理想的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、症状的缓解、疾病的任何直接或间接病理后果的减少、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或缓解疾病



状态以及缓解或改善预后。所述术语并不暗示完全治愈疾病或完全消除任何症状或对所有症状或结果的影响。

[0461] 如本文所用,“延迟疾病的发展”意指推迟、阻碍、减慢、延缓、稳定、抑制和/或延期疾病(如癌症)的发展。此延迟可以具有不同的时间长度,这取决于病史和/或所治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,足够或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会患上疾病。例如,可能延迟晚期癌症,如转移的发展。

[0462] 如本文所用,“预防”包括提供关于受试者的疾病的发生或复发的预防,所述受试者可能易患所述疾病但尚未被诊断患有所述疾病。在一些实施方案中,所提供的细胞和组合物用于延迟疾病的发展或延缓疾病的进展。

[0463] 如本文所用,“抑制”功能或活性是当与除了目标条件或参数以外的原本相同的条件相比时,或者与另一种条件相比时,减少功能或活性。例如,与不存在所述细胞的情况下的肿瘤生长速率相比,抑制肿瘤生长的细胞降低了肿瘤的生长速率。

[0464] 在给药的情况下,药剂(例如药物配制品、细胞或组合物)的“有效量”是指在必要的剂量/量下和必要的时间段内有效实现所需结果(例如治疗或预防结果)的量。

[0465] 药剂(例如药物配制品或工程化细胞)的“治疗有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需治疗结果(如针对治疗疾病、病症或障碍)和/或治疗的药代动力学或药效动力学作用的量。治疗有效量可根据诸如以下等因素而变化:疾病状态、受试者的年龄、性别和体重、以及所给予的免疫调节多肽或工程化细胞。在一些实施方案中,所提供的方法涉及以有效量(例如,治疗有效量)给予免疫调节多肽、工程化细胞或组合物。

[0466] “预防有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需预防结果的量。通常但不是必要地,因为在疾病之前或疾病的早期阶段在受试者中使用预防剂量,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0467] 所治疗的疾病或病症可以是任何疾病或病症,其中抗原的表达与疾病状况或障碍的病因学相关和/或参与其中,例如导致、加剧这种疾病、病症或障碍或以其他方式参与其中。示例性疾病和病症可以包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫性疾病或炎性疾病或例如由细菌、病毒或其他病原体引起的感染性疾病相关的疾病或病症。上文描述了示例性抗原,其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原。在具体实施方案中,免疫调节多肽和/或重组受体(例如嵌合抗原受体或转基因TCR)特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原。

[0468] 在一些实施方案中,疾病或病症是肿瘤,如实体瘤、淋巴瘤、白血病、血液肿瘤、转移性肿瘤或其他癌症或肿瘤类型。

[0469] 在一些实施方案中,疾病或病症是感染性疾病或病症,例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus,EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些实施方案中,所述疾病或病症是自身免疫性或炎性疾病或病症,如关节炎(例如类风湿性关节炎(RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘和/或与移植相关的疾病或病症。

[0470] 在一些实施方案中,与疾病或障碍相关的抗原选自 $\alpha v\beta 6$ 整合素( $\alpha v\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌

症/睾丸抗原1B (CTAG, 也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原 (CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CC基序趋化因子配体1 (CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白 (EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白 (tEGFR)、III型表皮生长因子受体突变 (EGFR vIII)、上皮糖蛋白2 (EPG-2)、上皮糖蛋白40 (EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2 (EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样5 (FCRL5; 也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体 (胎儿AchR)、叶酸结合蛋白 (FBP)、叶酸受体 $\alpha$ 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2 (OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100 (gp100)、G蛋白偶联受体5D (GPCR5D)、Her2/neu (受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3 (erb-B3)、Her4 (erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原 (HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1 (HLA-A1)、人白细胞抗原A2 (HLA-A2)、IL-22受体 $\alpha$  (IL-22Ra)、IL-13受体 $\alpha$ 2 (IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体 (kdr)、 $\kappa$ 轻链、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的8家族成员A (LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒 (CMV)、粘蛋白1 (MUC1)、MUC16、天然杀伤组2成员D (NKG2D) 配体、黑色素A (MART-1)、神经细胞粘附分子 (NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原 (PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白 (TPBG也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、Wilms肿瘤1 (WT-1)、病原体特异性抗原或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中,所述抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig $\kappa$ 、Ig $\lambda$ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0471] 在一些实施方案中,抗原是或包括病原体特异性抗原或病原体表达的抗原。在一些实施方案中,抗原是病毒抗原 (例如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。

[0472] 在一些实施方案中,与疾病或障碍相关的抗原选自孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、HER2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha$ 2、kdr、 $\kappa$ 轻链、路易斯Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、HER2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2和MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白 (如细胞周期蛋白A1 (CCNA1)) 和/或生物素化分子,和/或由HIV、HCV、HBV表达的分子或其他病原体。

[0473] 所提供的方法和用途包括用于过继细胞疗法的方法和用途。在一些实施方案中,所述方法包括将所述细胞或含有所述细胞的组合物给予至受试者、组织或细胞,如患有、有风险患上或怀疑患有所述疾病、病症或障碍的受试者、组织或细胞。在一些实施方案中,将所述细胞、群体和组合物给予至患有有待例如经由过继细胞疗法如过继T细胞疗法治疗的特定疾病或病症的受试者。在一些实施方案中,将所述细胞或组合物给予至所述受试者,如

患有或有风险患上所述疾病或病症的受试者,改善所述疾病或病症的一个或多个症状。

[0474] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)通过自体转移进行,其中从接受细胞疗法的受试者或从来源于这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备细胞。因此,在一些方面,所述细胞来源于需要治疗的受试者(例如,患者),并且在分离和加工后将所述细胞给予同一受试者。

[0475] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中从将要接受或最终接受细胞疗法的受试者以外的受试者(例如,第一受试者)分离和/或以其他方式制备细胞。在此类实施方案中,然后将所述细胞给予至相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,所述第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,所述第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中,所述第二受试者与所述第一受试者表达相同的HLA类别或超类型。细胞可以通过任何合适的方式给予。给药和给予可以部分取决于给予是短暂的还是长期的。各种给药方案包括但不限于在不同时间点的单次或多次给予、推注给予和脉冲输注。

[0476] 在某些实施方案中,所述细胞或单独的细胞亚型群体以约100万至约1000亿个细胞和/或按每公斤体重所述细胞量的范围给予受试者,例如,100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由任两个前述值定义的范围),如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由任两个前述值定义的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或在这些范围和/或每公斤体重的范围之间的任何值。剂量可以根据疾病或障碍和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。

[0477] 例如,在一些实施方案中,如果受试者是人,那么剂量包括少于约 $5 \times 10^8$ 个总重组受体(例如CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如,在约 $1 \times 10^6$ 到 $5 \times 10^8$ 个此类细胞的范围内,例如 $2 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个或全部此类细胞,或任两个前述值之间的范围。

[0478] 在一些实施方案中,细胞疗法包括给予一定剂量,所述剂量包含以下细胞数量:为或为约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$ 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),为或为约 $5 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$ 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),或者为或为约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),每个都包含端值。在一些实施方案中,细胞疗法包括给予一定剂量的细胞,所述剂量包含以下细胞数量:至少或至少约 $1 \times 10^5$ 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),如至少或至少 $1 \times 10^6$ 、至少或至少约 $1 \times 10^7$ 、至少或至少约 $1 \times 10^8$ 个此类细胞。在一些实施方案中,所述数量是关于CD3+或CD8+的总数,在一些情况下也是关于重组受体表达(例如CAR+)细胞。在一些实施方案中,细胞疗法包括给予一定剂量,所述剂量包含以下细胞数量:为或为约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^8$ 个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细胞、为或为约 $5 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$ 个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细

胞、或者为或为约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细胞,每个都包含端值。在一些实施方案中,细胞疗法包含给予一定剂量,所述剂量包含以下细胞数量:从或从约 $1 \times 10^5$ 至 $5 \times 10^8$ 个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞、从或从约 $5 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$ 个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞、或者从或从约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞,每个都包含端值。

[0479] 在一些实施方案中,剂量的T细胞包括CD4+T细胞、CD8+T细胞或CD4+和CD8+T细胞。

[0480] 在一些实施方案中,例如,如果受试者是人,那么所述剂量的CD8+T细胞(包括在剂量中包括CD4+和CD8+T细胞)包括在约 $1 \times 10^6$ 与 $5 \times 10^8$ 个之间的总重组受体(例如CAR)表达CD8+细胞,例如,在约 $5 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^8$ 个此类细胞的范围内,例如 $1 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $7.5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个总此类细胞,或在任两个前述值之间的范围。在一些实施方案中,给予患者多个剂量,并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,细胞剂量包括给予从或从约 $1 \times 10^7$ 至 $0.75 \times 10^8$ 个表达重组受体的总CD8+T细胞、 $1 \times 10^7$ 至 $2.5 \times 10^7$ 个表达重组受体的总CD8+T细胞、从或从约 $1 \times 10^7$ 至 $0.75 \times 10^8$ 个表达重组受体的总CD8+T细胞(每个都包含端值)。在一些实施方案中,细胞的剂量包含给予或给予约 $1 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $7.5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个总重组受体表达CD8+T细胞。

[0481] 在一些实施方案中,细胞(例如,表达重组受体的T细胞)的剂量作为单一剂量给予受试者,或者在两周、一个月、三个月、六个月、1年或更长的时间段内仅给予一次。

[0482] 在一些实施方案中,所述细胞作为组合治疗的一部分给予,如与另一种治疗性干预如抗体或工程化细胞或受体或其他药剂(如细胞毒性剂或治疗剂)同时给予或以任何顺序依次给予。在一些实施方案中,所述细胞与一种或多种另外的治疗剂共同给予或与另一种治疗性干预联合给予(同时或以任何顺序依次给予)。在一些情境下,将所述细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同给予,使得所述细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,所述细胞在一种或多种另外的治疗剂之前给予。在一些实施方案中,所述细胞在一种或多种另外的治疗剂之后给予。在一些实施方案中,一种或多种另外的药剂包括细胞因子(例如IL-2)以例如增强持久性。在一些实施方案中,所述方法包括给予化学治疗剂。

[0483] 在一些实施方案中,在给予细胞后,例如通过许多已知方法中的任一种测量工程化细胞群的生物学活性。待评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合,其在体内例如通过成像进行评估,或离体例如通过ELISA或流式细胞术进行评估。在某些实施方案中,可以使用本领域已知的任何合适的方法(如描述于例如Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009)和Herman等人J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)中的细胞毒性测定)测量工程化细胞破坏靶细胞的能力。在一些实施方案中,通过测定一种或多种细胞因子(例如CD107a、IFN $\gamma$ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量细胞的生物学活性。在一些方面,通过评估临床结果(如肿瘤负荷或负担的减少)来测量生物活性。

[0484] 在一些实施方案中,将工程化细胞以任何数量的方式进一步修饰,从而增加其治疗或预防功效。例如,可以将所述群体表达的工程化重组受体(如CAR或TCR)直接或通过接头间接缀合至靶向部分。将化合物(例如,CAR或TCR)与靶向部分缀合的实践在本领域是已

知的。参见例如, Wadwa等人, J. Drug Targeting 3:1 1 1 (1995) 和美国专利5,087,616。

#### [0485] B. 检测和监测

[0486] 在一些实施方案中, 提供了用于监测 (例如检测或鉴定) 给予至受试者的细胞的方法, 例如用于确定或评估受试者中此类细胞的存在、数量或位置的方法。在一些实施方案中, 从来自受试者的样品离体进行检测。在一些实施方案中, 检测在体内进行。

[0487] 在一些实施方案中, 监测方法是离体进行的, 并且包括通过使含有表达或可能表达细胞表面缀合物的细胞的组合物与能够识别细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触来检测表达细胞表面缀合物的细胞。在一些方面, 从受试者获得样品并将所述样品与结合所述缀合物的药剂的结合分子 (如抗体或非抗体试剂, 包括所描述的任何一种) 接触。例如, 生物样品包括但不限于体液 (如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品, 包括由其衍生的加工样品。

[0488] 在一些实施方案中, 可以使用如上所述的任何方法来检测或鉴定从受试者的样品获得的表达细胞表面缀合物的细胞。在某些实施方案中, 可以通过使用与药剂特异性结合的抗体或通过使用非抗体试剂 (例如, 与Strep-标签<sup>®</sup>结合的Strep-Tactin<sup>®</sup>) 离体检测或跟踪表达所述缀合物的重组细胞。在一些实施方案中, 所述药剂是链霉亲和素结合肽, 如Strep-标签, 包括如所描述的Strep-标签<sup>®</sup> II或双-Strep-标签。在一些实施方案中, 识别所述药剂的结合分子是能够可逆地结合所述药剂的试剂, 如链霉亲和素突变蛋白, 包括Strep-Tactin或特异性结合所述药剂的其他链霉亲和素突变蛋白。在一些实施方案中, 识别所述药剂的结合分子是抗体, 如抗Strep-标签抗体。

[0489] 在一些方面, 检测表达细胞表面缀合物的细胞之后是分离或选择与结合分子结合的细胞的步骤。在一些实施方案中, 可以进一步对细胞分析或评估一种或多种特性或活性, 如细胞表面表型 (基于细胞表面标记 (例如激活标记) 的表达)、重组受体 (例如CAR) 的表达; 或一种或多种抗原特异性活性, 包括细胞毒性活性、分泌细胞因子的能力或增殖能力。

[0490] 在一些实施方案中, 通过向受试者给予特异性结合所述缀合物的药剂的结合分子, 在体内执行监测方法。在一些实施方案中, 给予至受试者的结合分子是识别所述药剂 (如本文描述的任何一种) 的一种结合分子。在一些实施方案中, 所述药剂是链霉亲和素结合肽, 如Strep-标签, 包括如所描述的Strep-标签<sup>®</sup> II或双-Strep-标签。在一些实施方案中, 结合分子是能够可逆地结合所述药剂的非抗体剂, 如链霉亲和素突变蛋白, 包括Strep-Tactin或特异性结合所述药剂的其他链霉亲和素突变蛋白。在一些实施方案中, 识别所述药剂的结合分子是抗体, 如抗Strep-标签抗体。在一些实施方案中, 细胞 (如表达缀合物并因此重组受体的细胞) 的成像, 实时地揭示转导细胞在体内的位置。

[0491] 在此类方法的方面, 给予至受试者的结合分子是可溶性的。在实施方案中, 结合分子是抗体或是抗原结合片段, 所述抗体或抗原结合片段包含完整抗体的一部分, 所述部分结合完整抗体结合的药剂 (例如Strep-标签)。在其他实施方案中, 结合分子是能够与所述缀合物的药剂结合的非抗体试剂。

[0492] 在非抗体试剂 (如链霉亲和素突变蛋白, 包括Strep-Tactin或其他链霉亲和素突变蛋白) 的情况下, 结合分子不与固体支撑物结合, 即它以可溶形式存在或是可溶性的。原则上, 可以使用与在被固定在支撑物 (如固体支撑物或固定相, 如上面所述) 上的试剂的情

况相同的试剂。例如,可以使用上面描述的任何示例性试剂而不将这种试剂固定或附接到支撑物上,例如,不附着固体支撑物或固定相。在一些情况下,试剂是单个分子的寡聚物或聚合物、或构成单个分子的亚基的复合物的寡聚物或聚合物(例如二聚体、三聚体或四聚体蛋白质的寡聚物或聚合物)。在一些实施方案中,试剂可以是例如链霉亲和素突变蛋白寡聚物、钙调蛋白寡聚物、提供至少两个螯合基团K的化合物(寡聚物),其中所述至少两个螯合基团能够结合过渡金属离子,从而使得所述试剂能够结合寡聚组氨酸亲和标签、多聚体谷胱甘肽-S-转移酶、或生物素化的载体蛋白。

[0493] 在一些实施方案中,结合分子如非抗体试剂(例如链霉亲和素或突变蛋白,如四聚体链霉亲和素突变蛋白)的特征在于不存在与所述试剂附接的固体支撑物(表面)。例如,在一些实施方案中,试剂不包含或不(直接或间接地)附着于颗粒、珠、纳米颗粒、微球体或其他固体支撑物上。在一些实施方案中,试剂不是刚性的、非柔性的或坚硬的,或者不包含或不附接到刚性的、非柔性的或坚硬的表面上。在一些实施方案中,试剂是柔性的或基本上柔性的。在一些情况下,试剂能够调节或适应细胞表面的形式。在一些实施方案中,试剂不具有或不包含球形或基本上球形的形状。

[0494] 在一些实施方案中,基本上全部,即超过80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的结合分子如非抗体试剂(例如链霉亲和素或突变蛋白,如四聚体链霉亲和素突变蛋白)由有机材料构成或含有有机材料。例如,在一些实施方案中,超过80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的试剂是脂质、碳水化合物、蛋白质、肽或其混合物、由它们构成或含有它们。在一些实施方案中,结合分子如非抗体试剂(例如链霉亲和素或突变蛋白,如四聚体链霉亲和素突变蛋白)基本上不由无机材料、无机芯(例如金属,例如铁)、合成或无机聚合物(如苯乙烯聚合物,例如聚苯乙烯)、乳胶、二氧化硅或磁芯构成,或基本上不含有它们。例如,在一些实施方案中,试剂的无机材料的相对百分比或作为试剂的一部分包含的相对百分比为小于20%、15%、10%、5%或更少。

[0495] 在一些实施方案中,结合分子((例如链霉亲和素或突变蛋白,如四聚体链霉亲和素突变蛋白)如非抗体试剂)的总体积的大部分(即超过50%)如超过的60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多在水性溶液中由包含所述试剂的单个蛋白质分子(如单个分子或构成单个分子的亚基的复合物的寡聚物或聚合物(例如四聚体分子))组成。在一些实施方案中,可溶性试剂的总密度为小于 $1.2\text{g}/\text{cm}^3$ 、 $1.1\text{g}/\text{cm}^3$ 、 $1.0\text{g}/\text{cm}^3$ 或更小。

[0496] 在一些实施方案中,可溶性试剂(例如,没有附接到支撑物或固体支撑物上(例如没有附接到珠上))具有相对小的尺寸,如通常小于或约小于20nm的尺寸、如小于或约小于15nm、小于或约小于10nm、小于或约小于5nm或更小。

[0497] 在一些实施方案中,可溶性试剂(例如,没有附接到支撑物或固体支撑物上(例如没有附接到珠上))是生物学上惰性的,即它对活细胞无毒。在一些实施方案中,试剂可以是生物可降解的,例如,它可以通过酶促活性降解或被吞噬细胞清除。

[0498] 在一些实施方案中,使结合分子(如非抗体试剂(例如链霉亲和素突变蛋白或其寡聚物))与载体(如有机载体)反应是有可能的。在一些方面,除了与多糖的反应之外,还可以使用生理学上或药学上可接受的蛋白质如血清白蛋白(例如人血清白蛋白(HSA)或牛血清白蛋白(BSA))作为载体蛋白。在这样的情况下,试剂如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白

(作为单独的四聚体或还以寡聚物的形式)可以经由非共价相互作用与载体蛋白偶联。在一些此类实施方案中,生物素化的BSA(其可从多个供应商商购获得,例如ThermoFisher Scientific、Sigma Aldrich或Vectorlabs,仅举几例)可以与试剂(例如链霉亲和素突变蛋白)反应。在一些方面,一些药剂寡聚物(例如链霉亲和素寡聚物)可以经由一个或多个结合位点Z与生物素化的载体蛋白非共价结合,使得寡聚物的大部分结合位点Z可用于结合药剂(例如,受体结合剂或选择剂)和如本文描述的任何其他药剂。因此,通过这样的方法,可以制备具有多个结合位点Z的可溶性试剂。

[0499] 在其他实施方案中,试剂如链霉亲和素突变蛋白(作为单独的四聚体或还以寡聚物的形式)可以与合成的载体(如聚乙二醇(PEG)分子)共价偶联。例如,任何合适的PEG分子都可以用于此目的,并且所述PEG分子和相应的试剂可以是可溶性的。通常,高达1000Da分子量的PEG分子可溶于水或可以用于本发明方法的培养基中。在一些情况下,这种基于PEG的试剂可以使用可商购获得的激活PEG分子(例如,可从NOF North America Corporation, Irvine, California, USA获得的PEG-NHS衍生物,或可从Creative PEGWorks, Chapel Hills, North Carolina, USA获得的激活的PEG衍生物)与链霉亲和素突变蛋白的氨基基团来制备。

[0500] 在一些方面,使用结合分子(例如与提供信号或诱导在体内可检测的信号的部分缀合的抗体或非抗体试剂(例如链霉亲和素或突变蛋白,如四聚体链霉亲和素突变蛋白))进行体内检测。在一些实施方案中,结合分子与成像模式缀合。在一些方面,成像模式包括但不限于用于通过X射线、CT扫描、MRI扫描、PET扫描、超声波、流式细胞术、近红外成像系统或其他成像模式检测的荧光化合物、放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合物、酶、氧化铁纳米颗粒、或本领域已知的其他成像剂(参见例如, Yu等人, Theranostics 2:3, 2012)。

[0501] 在一些实施方案中,试剂用可检测标记来进行标记,所述可检测标记例如为生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合物、酶、氧化铁纳米颗粒、纳米颗粒、荧光化合物、荧光标记和酶。可检测标记/标签的例子包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶。合适的辅基复合物的例子包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素。合适的荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、荧光素异硫氰酸盐、罗丹明、二氯三嗪基氨基荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白。发光材料的例子包括鲁米诺。生物发光材料的例子包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白。在本文描述的诊断方法的某些实施方案中,可检测部分是放射性核素。在某些实施方案,放射性核素选自 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{87}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{108}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{60}\text{Cu}$ 、 $^{61}\text{Cu}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{82}\text{Rb}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{87}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 和 $^{201}\text{Tl}$ 。

[0502] 在一些实施方案中,用于检测细胞的体内成像方法可以是磁共振成像(MRI)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、计算机断层扫描(CT)、计算机轴向断层扫描(CAT)、电子束计算机断层扫描(EBCT)、高分辨率计算机断层扫描(HRCT)、内摆线断层扫描、正电子发射断层扫描(PET)、闪烁扫描、 $\gamma$ 照相机、 $\beta^+$ 检测器、 $\gamma$ 检测器、荧光成像、低光成像、X射线、生物发光成像和其他成像模式。

[0503] 在一些实施方案中,可以通过检测和/或监测所述缀合物的细胞表面分子部分来

进行检测和/或监测。例如,在一些实施方案中,可以通过与结合分子或靶向分子接触来检测和/或监测经修饰的细胞表面分子,所述结合分子或靶向分子可以结合或靶向细胞表面分子并且可以被检测,例如含有可检测的标记。在一些实施方案中,可以使用对应的抗体或其抗原结合片段或其他细胞表面分子靶向分子(如表1中所描述的任何抗体或其抗原结合片段)来检测细胞表面缀合物。在一些实施方案中,此类抗体或其抗原结合片段或其他靶向分子可以用于本文提供的任何检测或监测方法中。

[0504] 在一些实施方案中,靶向、检测和/或监测细胞表面缀合物的细胞表面分子部分的靶向分子可以包括例如抗体,所述抗体包括但不限于3F8、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗、阿德木单抗(adecatumumab)、阿夫土珠(afutuzumab)、阿仑单抗、喷替酸阿妥莫单抗(altumomab pentetate)、麻安莫单抗(anatumomab mafenatox)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿西莫单抗、阿塞珠单抗(aselizumab)、阿特殊单抗(atlizumab)(=托西珠单抗(tocilizumab))、巴利昔单抗、贝妥莫单抗(bectumomab)、贝那利珠单抗(benralizumab)、贝索单抗(besilesomab)、莫比伐珠单抗(bivatuzumab mertansine)、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、莫坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)、卡罗单抗喷地肽(capromab pendetide)、卡妥索单抗(catumaxomab)、CC49、西利珠单抗(cedelizumab)、西莫白介素(celmoleukin)、泊西他珠单抗(citatumumab bogatox)、克立昔单抗(clenoliximab)、泰坦-克利妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)、CNT0-95、可那木单抗(conatumumab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、达利珠单抗(daclizumab)、达雷木单抗(daratumumab)、地莫单抗(detumomab)、依美昔单抗(ecromeximab)、依决洛单抗(edrecolomab)、依法利珠单抗(efalizumab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、PEG化恩莫单抗(enlimomab pegol)、西依匹莫单抗(epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄利珠单抗(erlizumab)、埃达珠单抗(etaracizumab)、法索单抗(fanolesomab)、法拉莫单抗(faralimomab)、法勒珠单抗(farletuzumab)、加利昔单抗(galiximab)、加维莫单抗(gavilimomab)、吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)、维汀-格仑妥木单抗、戈利昔单抗(gomiliximab)、伊巴利珠单抗(ibalizumab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗(igovomab)、英妥木单抗(intetumumab)、伊妥木单抗(iratumumab)、伊诺莫单抗(inolimomab)、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、伊匹木单抗(ipilimumab)、凯利昔单抗(keliximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、林妥珠单抗(lintuzumab)、来沙木单抗(lexatumumab)、鲁卡木单抗(lucatumumab)、鲁昔单抗(lumiliximab)、马帕木单抗(mapatumumab)、马司莫单抗(maslimomab)、米拉妥珠单抗(milatuzumab)、明瑞莫单抗(minretumomab)、米妥莫单抗(mitumomab)、莫罗单抗(muromonab)-CD3、他那莫单抗(naptumomab estafenatox)、那他株单抗(natalizumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥度莫单抗(odulimomab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥拉单抗(olaratumab)、莫奥珠单抗(oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗(oregovomab)、奥昔珠单抗(otelixizumab)、喷妥莫单抗(pemtumomab)、普立昔单抗(priliximab)、PRO 140、利妥昔单抗(rituximab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、鲁利单抗(ruplizumab)、沙妥莫单抗喷地肽(satumomab pendetide)、西利珠单抗(siplizumab)、索土珠单抗(sontuzumab)、他多赛珠单抗(tadocizumab)、帕他普莫单抗(taplutumomab paptox)、替奈昔单抗(teneliximab)、特普利珠单抗(teplizumab)、TGN1412、替西木单抗(ticilimumab)(=曲美木单抗(tremelimumab))、替加



珠单抗(tigatuzumab)、托西珠单抗(tocilizumab)(=atlizumab)、托利珠单抗(toralizumab)、托西莫单抗(tositumomab)、曲美木单抗(tremelimumab)、妥考妥珠单抗、维多株单抗(vedolizumab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、维西珠单抗(visilizumab)、vitaxin、伏洛昔单抗(volociximab)、伏妥莫单抗(votumumab)、扎木单抗(zanolimumab)、齐拉木单抗(ziralimumab)、阿佐莫单抗(zolimomab aritox)。阿特殊单抗(Atezolizumab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)(Avastin®)、地诺单抗(denosumab)、地努图希单抗(dinutuximab)、纳武单抗(nivolumab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、皮地利珠单抗(pidilizumab)(CT-011)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、司妥昔单抗(siltuximab)、曲妥珠单抗-美坦新偶联物(ado-trastuzumab emtansine)、CEA-scan Fab片段、0C125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C、MEDI4736、或其抗原结合片段、其类似物或衍生物、或选自以下的抗原结合抗体片段:Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、单链Fv(scFv)或二硫化物稳定的Fv(dsFv)。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子包含由上述抗体或其抗原结合片段中任何一种识别的表位。

[0505] 在一些实施方案中,细胞表面分子是PSMA或其修饰形式。在一些实施方案中,结合分子或靶向分子是或包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,结合分子或靶向分子是或包含配体和/或小分子。在一些实施方案中,结合分子是或包含能够结合PSMA的活性位点或底物结合位点的小分子。在一些实施方案中,结合分子是或包含PSMA和/或其修饰形式的拮抗剂、选择性拮抗剂、反向激动剂、选择性反向激动剂、激动剂、选择性激动剂、抑制剂和/或选择性抑制剂。在一些实施方案中,结合分子是或包含PSMA的抑制剂。在一些实施方案中,结合分子是或包含小分子、和/或低分子量分子和/或低分子量抑制剂。在一些实施方案中,结合分子是或包含能够结合PSMA或其修饰形式的部分,所述部分是小分子和/或可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分能够产生可检测的信号。在一些情形中,可检测部分含有荧光蛋白和/或放射性核素。在一些实施方案中,结合分子或靶向分子是或包括适体、肽或其缀合物。

[0506] 在一些实施方案中,结合分子或靶向分子是或包括抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自J591、DF0-J591、CYT-356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107-1A4、YPSMA-1、YPSMA-2、3E6、2G7、24.4E6、GCP-02、GCP-04、GCP-05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7-Fc、D7-CH3、4D4、A5、或其抗原结合片段、其类似物或衍生物、或选自以下的抗原结合抗体片段:Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、单链Fv(scFv)或二硫化物稳定的Fv(dsFv)。在一些实施方案中,经修饰的细胞表面分子包含由上述抗体或其抗原结合片段中任何一种识别的表位。

[0507] 在一些实施方案中,结合分子或靶向分子是或包括在以下文献中描述的那些、或其片段、其缀合物或其衍生物:US 2002/0049712;US 2002/0147312;US 2003/0082187;US 2004/0136998;US 2005/0202020;US 2006/0088539;US 2007/0071759;US 2010/0297653;US 2011/0020273;US 2013/0225541;US 2013/0315830;US 2014/0099257;US 2014/0227180;US 2015/0168413;US 2016/0303253;US 2017/0051074;US 6572856;US 7476513;US 8470330;US 8986655;WO 2006/078892;WO 2010/135431;WO 2014/198223;WO 2015/177360;WO 2016/057917;WO 2016/130819;WO 2016/145139;WO 2016/201300;WO 2017/004144;WO 2017/023761;AU 2002/356844;AU 2006/204913;AU 2006/235421;AU

2006/262231;AU 2006/315500;AU 2010/325969;AU 2013/328619;AU 2015/205574;CA 2353267;EP 1390069;EP 1520588;EP 1581794;EP 1599228;EP 1610818;EP 2906250; Banerjee等人(2011) Angew Chem Int Ed Engl.50 (39) :9167-9170;Maurer等人(2016) Nature Reviews Urology 13:226-235;Rowe等人(2016) Prostate Cancer Prostatic Dis.19 (3) :223-230;Mease等人, (2013) Curr Top Med Chem.13 (8) :951-962;Osborne等人, (2013) Urol Oncol.31 (2) :144-154;Philipp Wolf(2011), Prostate Specific Membrane Antigen as Biomarker and Therapeutic Target for Prostate Cancer, Prostate Cancer-Diagnostic and Therapeutic Advances, Dr.Philippe E.Spiess (编辑), Intech, 第81-100页;Ruggiero等人, (2011) J Nucl Med.52 (10) :1608-1615;Liu等人, (1997) Cancer Research 57:3629-3634;Regino等人, (2009) Curr Radiopharm. January;2 (1) :9-17;Kampmeier等人(2014) EJNMMI Research 4:13;Wolf等人, (2010) The Prostate 70:562-569;Tykvart等人(2014) The Prostate 74:1674-1690;Jin等人, (2016) EMJ Urol.4 (1) :62-69以及Tino等人(2000) Hybridoma 19 (3) :24957。

#### [0508] C.自杀杀伤

[0509] 在一些实施方案中,提供了可以用于例如经由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)介导的或经由用细胞毒性剂特异性靶向细胞介导的在体内消融和/或耗尽工程化细胞的方法。

#### [0510] 1.ADCC

[0511] 在一些实施方案中,细胞表面缀合物可以用于诱导细胞自杀。例如,细胞表面分子(例如本文描述的经修饰的细胞表面分子)可以经由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)途径用作自杀基因。ADCC是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体的非特异性细胞毒性细胞(如天然杀伤细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并导致靶细胞的裂解。可以使用诸如在美国专利号5,821,337中所描述的那些方法来评估ADCC活性。

[0512] 在一些实施方案中,ADCC可以通过向受试者给予靶向所述缀合物的细胞表面分子的任何抗体来介导。在一些实施方案中,表1中提供的示例性经修饰的细胞表面分子可以通过向受试者给予表1中提供的对应抗体介导的ADCC激活而用作自杀基因。在一些方面,经修饰的EGFR细胞表面分子可以经由西妥昔单抗介导的ADCC激活而用作自杀基因。在一些方面,由西妥昔单抗或ADCC途径介导的自杀杀伤不受利用与细胞表面分子连接的药剂(Strep-标签<sup>®</sup>)的选择过程的影响。在一些方面,被工程化以在细胞表面上表达的PSMA或其修饰形式可以经由给予结合分子或靶向分子(其是抗PSMA抗体,如本文描述的任何一种),通过ADCC激活而用作自杀基因。在另一个实施方案中,消除表达本文提供的细胞表面缀合物的工程化T细胞可以通过给予对缀合物的药剂(例如亲和和标签)具特异性的抗体来实现。对亲和和标签具特异性的示例性抗体药剂(包括本文描述的那些)是已知的。在一些实施方案中,如果使用链霉亲和素结合肽(如Strep-标签<sup>®</sup>)作为药剂,则可以使用抗Strep-标签<sup>®</sup>抗体或抗Strep-标签<sup>®</sup> scFv来激活ADCC途径。示例性的抗Strep-标签抗体包括可商购获得的StrepMAB-Classic、单克隆抗体StrepMAB-Immo (IBA)、抗Strep标签II抗体(Genscript)或Strep-标签抗体(Qiagen)。

#### [0513] 2.由细胞毒性分子靶向的药剂

[0514] 在一些实施方案中,通过向受试者给予对所述缀合物的药剂(例如亲和标签)具特异性的细胞毒性分子来实现自杀杀伤。在一些实施方案中,此类细胞毒性分子包括其中对所述药剂具特异性的结合分子(包括抗体或非抗体试剂)与细胞毒性剂缀合的那些。在此类方法的方面,当受试者已知或怀疑具有或可能具有或发生对给予的细胞的不良副作用(如与工程化细胞的毒性或免疫原性相关的不良副作用)时,将细胞毒性分子给予至受试者。

[0515] 在一些实施方案中,结合分子是链霉亲和素突变蛋白(如所描述的任何一种,包括Strept-Tactin或其他链霉亲和素突变蛋白),或是其寡聚物。本文还提供了与细胞毒性剂连接或缀合的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白、或链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的寡聚物,如本文描述的任何一种。在一些方面,结合分子试剂包含SEQ ID NO:3-6、27或28中任一个中所示的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或展现与SEQ ID NO:3-6、27或28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,并且结合链霉亲和素结合肽药剂(例如Strep-标签)。在一些实施方案中,结合分子是对所述药剂具特异性的抗体或抗原结合片段。

[0516] 在一些情况下,细胞毒性剂可以是毒素或放射性金属。其他细胞毒性剂包括但不限于细胞毒性组分(例如,化学治疗药物如抗有丝分裂剂(例如长春地辛)、抗叶酸剂、烷化剂(例如替莫唑胺)、细菌毒素、蓖麻毒素、抗病毒剂、放射性同位素、放射性金属)。当靶向特定细胞时,此类细胞毒性剂可以用于特异性杀伤工程化细胞或使工程化细胞失能,例如,当不需要重组受体的活性时。

[0517] 在一些实施方案中,细胞毒性试剂是细菌毒素,所述细菌毒素属于细菌毒素(称为AB毒素)的主要类别,其使用将酶(A单元)活跃地转移到细胞中的转运蛋白(B或结合单元)。AB毒素的例子包括肉毒杆菌神经毒素、炭疽毒素、白喉毒素、志贺毒素、志贺样毒素、外毒素A和霍乱毒素。由于所有这些毒素之间的类似作用机制,所有这些毒素都被认为在本发明的各个方面中起作用。这些和各种其他毒素的A和B组分是熟知的。

[0518] 细菌毒素通常具有两个功能不同的部分,称为A和B。“A”组分通常是“活性”部分,并且“B”组分通常是“结合”部分。因此,A部分或组分含有催化活性,而B部分或组分拥有将A部分细胞质递送到靶细胞中所需的决定簇。这些递送决定簇包括受体结合活性,并且通常但不总是包括膜穿透活性。许多细菌毒素如白喉毒素在单一多肽内含有两个部分。相比之下,炭疽毒素是所谓的二元毒素的成员,这是A和B功能位于不同的蛋白质中的一种类别。虽然是不同的,但是具有A和B功能的蛋白质在细胞中毒期间相互作用。炭疽毒素使用单一B部分(保护性抗原(PA;83kDa))来将两个替代性A部分(水肿因子(EF;89kDa)和致死因子(LF;89kDa))递送到细胞质中(关于细菌毒素的例子,参见国际专利申请公开号W0 2012096926)。

[0519] 在一些方面,所述毒素是肽毒素、蓖麻毒素A链毒素、相思豆毒素A链、白喉毒素(DT)A链、假单胞菌外毒素、志贺毒素A链、白树毒素、苦瓜毒蛋白(Momordin)、美洲商陆抗病毒蛋白、皂草素、天花粉蛋白或大麦毒素。在一些方面,所述毒素是光毒素。在一些实施方案中,所述肽毒素包含在SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。

[0520] 在一些实施方案中,细胞毒性剂的给予不会或基本上不会诱导健康组织或健康细胞的、不含工程化细胞和/或不表达所述抗原的细胞或组织的杀伤或破坏。

### [0521] 3.二聚化介导的杀伤

[0522] 在一些实施方案中,通过使用具有细胞内信号传导结构域的细胞表面缀合物来实现表达细胞表面缀合物的细胞的自杀杀伤,所述细胞内信号传导结构域能够例如在二聚化时介导细胞的杀伤。在一些实施方案中,杀伤是经由半胱天冬酶活性介导的,所述半胱天冬酶活性启动导致细胞凋亡的细胞破坏。在一些方面,细胞表面缀合物包含半胱天冬酶-9的信号传导结构域,其是细胞凋亡途径的一部分。

[0523] 在一些实施方案中,通过向受试者给予与所述缀合物的药剂特异性结合的结合分子来进行二聚化。在一些实施方案中,结合分子与所述缀合物的药剂的结合诱导半胱天冬酶亚基的二聚化,并且通过信号传导结构域诱导、调节、激活、介导和/或促进信号传导。在一些实施方案中,二聚化可能导致细胞的半胱天冬酶-9依赖性细胞死亡。

[0524] 在一些实施方案中,给予至受试者的结合分子是识别所述药剂(如本文描述的任何一种)的一种结合分子。在一些实施方案中,所述药剂是链霉亲和素结合肽,如Strep-标签,包括如所描述的Strep-标签®II或双-Strep-标签。在一些实施方案中,结合分子是非抗体剂,所述非抗体剂能够特异性地并且在一些情况下可逆地结合所述药剂如链霉亲和素突变蛋白(包括Strep-Tactin或其他链霉亲和素突变蛋白及其寡聚物)。在一些实施方案中,识别所述药剂的结合分子是抗体,如抗Strep-标签抗体。

### [0525] VII. 定义

[0526] 如本文所用,叙述核苷酸或氨基酸位置“对应于”所公开序列中的核苷酸或氨基酸位置(例如序列表中所示)是指,在使用标准比对算法(例如GAP算法)与所公开序列比对以使同一性最大化之后,所鉴定的核苷酸或氨基酸位置。通过比对序列,本领域技术人员可以例如使用保守和相同的氨基酸残基作为指导来鉴定相应的残基。通常,为了鉴定对应位置,比对氨基酸序列使得获得最高阶匹配(参见,例如:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑, M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo 等人 (1988) SIAM J Applied Math 48:1073)。

[0527] 如本文所用的术语“载体”是指能传播其所连接的另一核酸分子的核酸分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够指导它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。载体包括病毒载体,例如逆转录病毒(例如 $\gamma$  逆转录病毒和慢病毒)载体。

[0528] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和源自其的后代,不考虑传代次数。后代的核酸含量可能与亲代细胞不完全相同,但可能含有突变。本文包括如在初始转化细胞中所筛选或选择的,具有相同功能或生物活性的突变体后代。

[0529] 如本文所用,细胞或细胞群对特定标记呈“阳性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中的可检测的存在。当提及表面标记时,所述术语是指如通过流式

细胞术检测到的,表面表达的存在,例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上与已知对所述标记呈阳性的细胞的水平相似,和/或所述水平基本上高于已知对所述标记呈阴性的细胞的水平。

[0530] 如本文所用,细胞或细胞群对特定标记呈“阴性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中不存在实质上可检测的存在。当提及表面标记时,所述术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的不存在,例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色通过流式细胞术以如下水平没有检测到,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上低于已知对所述标记呈阳性的细胞的水平,和/或所述水平与已知对所述标记呈阴性的细胞的水平相比是基本上相似的。

[0531] 如本文所用,在关于氨基酸序列(参考多肽序列)使用时,“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同一性百分比”定义为,在比对序列并在必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视作序列同一性的一部分之后,候选序列(例如,主题抗体或片段)中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域熟知的多种方式来实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对的适当参数,包括在所比较序列的全长中实现最大比对所需的任何算法。

[0532] 如本文所用的,单数形式“一种/个(a/an)”和“所述(the)”包括复数种/个指示物,除非上下文另外明确说明。例如,“一种/个(a或an)”意指“至少一种/个”或“一种/个或多个/个”。应理解,本文描述的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“基本上由方面和变化组成”。

[0533] 贯穿本公开文本,所要求保护的主题的各个方面以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对所要求保护的主题的范围的僵硬限制。因此,应当认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的各个数值。例如,在提供一系列值的情况下,应当理解,在所述范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所述范围内的任何其他所述或中间值包含在所要求保护的主题内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在所述较小范围内,并且也涵盖在所要求保护的主题内,受制于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述范围包括限制中的一者或两者的情况下,排除了那些包括的限制中的任一者或两者的范围也包括在所要求保护的主题内。无论范围的广度如何,这都适用。

[0534] 如本文所用术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的通常误差范围。本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)针对所述值或参数本身的实施方案。例如,涉及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0535] 如本文所用的,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任何组合。

[0536] 如本文所用,“受试者”是哺乳动物,如人或其他动物,并且通常是人。

[0537] 除非另外定义,否则本文使用的所有领域术语、符号和其他技术和科学术语或命

名旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中不包含的此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0538] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入,在程度上如同每个单独的出版物通过引用单独并入。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义相反或在其他方面不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0539] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0540] VIII. 示例性实施方案

[0541] 所提供的实施方案包括:

[0542] 1. 一种细胞表面缀合物,其包含:

[0543] (a) 细胞表面分子,所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;以及

[0544] (b) 与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂能够结合链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

[0545] 2. 实施方案1的细胞表面缀合物,其中所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的对链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的结合亲和力。

[0546] 3. 一种细胞表面缀合物,其包含:

[0547] (a) 细胞表面分子,所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;以及

[0548] (b) 至少一种药剂,所述至少一种药剂被连接至所述细胞表面分子并且能够可逆地结合试剂和/或能够在竞争物质的存在下被竞争,其中所述药剂是长度为小于50个氨基酸的肽。

[0549] 4. 实施方案3的细胞表面缀合物,其中所述药剂展现平衡解离常数( $K_D$ )为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的对所述试剂的结合亲和力。

[0550] 5. 实施方案3或实施方案4的细胞表面缀合物,其中所述试剂是链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

[0551] 6. 一种细胞表面缀合物,其包含:

[0552] (a) 细胞表面分子,所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;以及

[0553] (b) 与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂,所述药剂具有平衡解离常数( $K_D$ )为大于 $10^{-7}$ M或平衡缔合常数( $K_A$ )为小于 $10^7$ M<sup>-1</sup>的对试剂的结合亲和力。

[0554] 7. 实施方案6的细胞表面缀合物,其中所述试剂是链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

[0555] 8. 实施方案1-7中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子包含跨膜结构域和/或能够在所述细胞的表面上表达。

[0556] 9. 实施方案1-8中任一项的细胞表面缀合物,其中与参考细胞表面分子相比,所述细胞表面分子是经修饰的,任选地其中所述参考细胞表面分子是包含细胞内信号传导结构域的细胞表面受体。

[0557] 10. 实施方案9的细胞表面缀合物, 其中与所述参考细胞表面分子相比, 所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

[0558] 11. 一种细胞表面缀合物, 其包含:

[0559] (a) 与参考细胞表面分子相比被修饰的细胞表面分子, 其中与所述参考细胞表面分子相比, 所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合; 以及

[0560] (b) 与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂, 所述药剂能够结合链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

[0561] 12. 实施方案11的细胞表面缀合物, 其中所述细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。

[0562] 13. 一种细胞表面缀合物, 其包含:

[0563] (a) 包含前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的细胞表面分子或其经修饰的细胞表面分子; 以及

[0564] (b) 与所述细胞表面分子连接的至少一种药剂, 所述药剂能够结合链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

[0565] 14. 实施方案13的细胞表面缀合物, 其中:

[0566] 所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导; 和/或

[0567] 所述经修饰的细胞表面分子与参考细胞表面分子相比被修饰, 其中与所述参考细胞表面分子相比, 所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

[0568] 15. 实施方案11-14中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述细胞表面分子包含跨膜结构域和/或能够在所述细胞的表面上表达。

[0569] 16. 实施方案11-15中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的对链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白的结合亲和力。

[0570] 17. 实施方案1-16中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述试剂的结合是可逆的和/或能够在竞争物质的存在下被竞争。

[0571] 18. 实施方案17的细胞表面缀合物, 其中所述竞争物质对所述试剂展现的结合亲和力高于所述药剂对所述试剂展现的结合亲和力。

[0572] 19. 实施方案18的细胞表面缀合物, 其中:

[0573] 所述竞争物质展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为在或约在 $10^{-10}$ M与 $10^{-14}$ M之间的对所述试剂的结合亲和力; 和/或

[0574] 所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为大于 $10^{-10}$ M的对所述试剂的结合亲和力。

[0575] 20. 实施方案1、2、5、7-20中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白的结合是可逆的和/或能够在生物素、生物素类似物或其生物活性片段的存在下被竞争。

[0576] 21. 实施方案1-20中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述至少一种药剂直接与所述细胞表面分子连接。

[0577] 22. 实施方案1-20中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述至少一种药剂经由至少一个接头间接与所述细胞表面分子连接。

[0578] 23. 实施方案1-22中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述至少一种药剂包含从或从约1种至4种、或1种至2种药剂。

[0579] 24. 实施方案1-23中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述至少一种药剂仅包含一种药剂。

[0580] 25. 实施方案1-24中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述细胞表面分子的细胞外部分或区域连接, 任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

[0581] 26. 实施方案1-25中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂被连接在所述细胞表面分子的N末端。

[0582] 27. 实施方案1-26中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂被连接在所述细胞表面分子的C末端。

[0583] 28. 一种细胞表面缀合物, 所述细胞表面缀合物包含在所述细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子, 所述药剂能够结合作为或包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的试剂, 任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

[0584] 29. 一种细胞表面缀合物, 所述细胞表面缀合物包含在所述细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子, 所述药剂能够可逆地结合试剂, 其中所述药剂是长度为小于50个氨基酸的肽, 任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

[0585] 30. 实施方案28或实施方案29的细胞表面缀合物, 其中所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为从或从约 $10^{-4}$ M至或至约 $10^{-10}$ M的结合亲和力。

[0586] 31. 一种细胞表面缀合物, 所述细胞表面缀合物包含在所述细胞表面分子的细胞外部分或区域与药剂连接的细胞表面分子, 其中所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为大于 $10^{-7}$ M或平衡缔合常数 ( $K_A$ ) 为小于 $10^7$ M $^{-1}$ 的对试剂的结合亲和力, 任选地其中所述细胞外部分或区域位于所述细胞表面分子的N末端或C末端。

[0587] 32. 实施方案28-31中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂被连接在所述细胞表面分子的N末端。

[0588] 33. 实施方案28-31中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂被连接在所述细胞表面分子的C末端。

[0589] 34. 实施方案28-33中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述试剂是或包含链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白。

[0590] 35. 实施方案28-34中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述药剂与所述试剂的结合是可逆的和/或能够在竞争物质的存在下被竞争。

[0591] 36. 实施方案35的细胞表面缀合物, 其中所述竞争物质对所述试剂展现的结合亲和力高于所述药剂对所述试剂展现的结合亲和力。

[0592] 37. 实施方案36的细胞表面缀合物, 其中:

[0593] 所述竞争物质展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为在或约在 $10^{-10}$ M与 $10^{-14}$ M之间的对所述试



剂的结合亲和力;和/或

[0594] 所述药剂展现平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为大于 $10^{-10}M$ 的对所述试剂的结合亲和力。

[0595] 38. 实施方案28、34-37中任一项的细胞表面缀合物,其中所述药剂与所述链霉亲和素、链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白的结合是可逆的和/或能够在生物素或生物素类似物的存在下被竞争。

[0596] 39. 实施方案28-38中任一项的细胞表面缀合物,其中所述药剂直接与所述细胞表面分子连接。

[0597] 40. 实施方案28-38中任一项的细胞表面缀合物,其中所述药剂经由至少一个接头间接与所述细胞表面分子连接。

[0598] 41. 实施方案28-40中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子仅与一种药剂连接。

[0599] 42. 实施方案1-41中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子不是嵌合抗原受体(CAR)。

[0600] 43. 实施方案28-30中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子与参考细胞表面分子相比是经修饰的。

[0601] 44. 实施方案43的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导;和/或与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

[0602] 45. 实施方案43或实施方案44的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是天然哺乳动物细胞表面分子。

[0603] 46. 实施方案1-45中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面分子包含能够由抗体或其抗原结合片段识别的表位。

[0604] 47. 实施方案1-33中任一项的细胞表面缀合物,其是融合蛋白。

[0605] 48. 实施方案1、2、5、7-28和34-47中任一项的细胞表面缀合物,其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与位置44至47对应的序列位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。

[0606] 49. 实施方案1、2、5、7-28和34-48中任一项的细胞表面缀合物,其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

[0607] a) 在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列;

[0608] b) 如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或

[0609] c) a) 或b) 的功能片段,所述功能片段结合所述药剂。

[0610] 50. 实施方案48或实施方案49的细胞表面缀合物,其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与117、120和/或121对应的位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步包含一个或多个氨基酸置换。

[0611] 51. 实施方案50的细胞表面缀合物,其中:

[0612] 所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>；或

[0613] 所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一个或多个；或

[0614] 所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。

[0615] 52. 实施方案1、2、5、7-28和34-51中任一项的细胞表面缀合物，其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含：

[0616] a) 在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列；

[0617] b) 如下氨基酸序列，所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂；或

[0618] c) a) 或b) 的功能片段，所述功能片段结合所述药剂。

[0619] 53. 实施方案3-5、17-19和35-37中任一项的细胞表面缀合物，其中所述竞争物质是或包含生物素、生物素类似物或其生物活性片段。

[0620] 54. 实施方案1-53中任一项的细胞表面缀合物，其中所述药剂是亲和标签。

[0621] 55. 实施方案3、4、6、8-10、17-19、21-27、29-33、35-37、39-47和54中任一项的细胞表面缀合物，其中所述药剂是或包含Strep标签、His标签、Flag标签、Xpress标签、Avi标签、钙调蛋白 (Calmodulin) 标签、聚谷氨酸盐 (Polyglutamate) 标签、HA标签、Myc标签、Nus标签、S标签、X标签、SBP标签、Softag、V5标签、CBP、GST、MBP、GFP、硫氧还蛋白 (Thioredoxin) 标签或其任何组合。

[0622] 56. 实施方案1-55中任一项的细胞表面缀合物，其中所述药剂是或包含一种或多种链霉亲和素结合肽，其任选地是Strep标签。

[0623] 57. 实施方案56的细胞表面缀合物，其中所述链霉亲和素结合肽包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8) 或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。

[0624] 58. 实施方案56或实施方案57的细胞表面缀合物，其中所述药剂包含序列

[0625] Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0626] 59. 实施方案9-58中任一项的细胞表面缀合物，其中所述参考细胞表面分子是细胞表面受体、配体、糖蛋白、细胞粘附分子、抗原、整合素或分化簇 (CD)。

[0627] 60. 实施方案59的细胞表面缀合物，其中所述参考细胞表面分子是细胞表面受体。

[0628] 61. 实施方案9-60中任一项的细胞表面缀合物，其中所述参考细胞表面分子选自EpCAM；VEGFR；整合素，任选地整合素 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha IIb\beta 3$ 、 $\alpha 4\beta 7$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 或 $\alpha v$ ；TNF受体超家族的成员，任选地TRAIL-R1或TRAIL-R2；表皮生长因子受体家族的成员；PDGF受体；干扰素受体；叶酸受体；GPNMB；ICAM-1；HLA-DR；CEA；CA-125；MUC1；TAG-72；IL-6受体；5T4；GD2；GD3；前列腺特异性膜抗原 (PSMA)；或分化簇细胞表面分子，任选地CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、

CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/基础免疫球蛋白、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5和CD319/SLAMF7。

[0629] 62. 实施方案9-61中任一项的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是表皮生长因子受体家族的成员。

[0630] 63. 实施方案9-62中任一项的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是表皮生长因子受体(EGFR)、erbB-2受体酪氨酸蛋白激酶(erbB2,HER2)、erbB-3受体酪氨酸蛋白激酶、erbB-4受体酪氨酸蛋白激酶、肝细胞生长因子受体(HGFR/c-MET)或胰岛素样生长因子受体-1(IGF-1R)。

[0631] 64. 实施方案9-63中任一项的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是人的。

[0632] 65. 实施方案9-64中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子缺乏功能性细胞内信号传导结构域和/或不能介导细胞内信号传导。

[0633] 66. 实施方案9-65中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子被截短以缺乏所述细胞内信号传导结构域或运输结构域的全部或一部分。

[0634] 67. 实施方案9-66中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考细胞表面分子相比,所述经修饰的细胞表面分子展现改变的细胞内化、酶促活性和/或配体结合。

[0635] 68. 实施方案9-67中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子包含所述参考细胞表面分子的一个或多个细胞外结构域。

[0636] 69. 实施方案9-68中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子能够结合所述参考细胞表面分子的天然配体和/或底物。

[0637] 70. 实施方案9-68中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子与所述参考细胞表面分子的天然配体和/或底物的结合减少,或所述经修饰的细胞表面分子不结合所述参考细胞表面分子的天然配体和/或底物。

[0638] 71. 实施方案70的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的细胞表面分子包含所述参考细胞表面分子的至少一个细胞外结构域,但缺乏由所述参考细胞表面分子的天然配体和/或底物识别的一个或多个其他细胞外结构域。

[0639] 72. 实施方案71的细胞表面缀合物,其中所述至少一个细胞外结构域包含由特异性地结合所述参考细胞表面分子的抗体或其抗原结合片段识别的表位。

[0640] 73. 实施方案46-72中任一项的细胞表面缀合物,其中所述抗体或抗原结合片段选自AMG-102、AMG-479、BIB0220A-5D5、CP-751,871、IMC-A12、R1507、3F8、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗、阿德木单抗(adecatumumab)、阿夫土珠(afutuzumab)、阿仑单抗、喷替酸阿妥莫单抗(alutumomab pentetate)、麻安莫单抗(anatumomab mafenatol)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿西莫单抗、阿塞珠单抗(aselizumab)、阿特珠单抗(atlizumab)(=托西珠单抗(tocilizumab))、巴利昔单抗、贝妥莫单抗(bectumomab)、贝那利珠单抗(benralizumab)、贝索单抗(besilesomab)、莫比伐珠单抗(bivatuzumab mertansine)、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、莫坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)、卡罗单抗喷地肽(capromab pendetide)、卡妥索单抗(catumaxomab)、CC49、西利珠单抗

(cedelizumab)、西莫白介素 (celmoleukin)、西妥昔单抗、西妥木单抗 (cixutumumab)、克立昔单抗 (clenoliximab)、泰坦-克利妥珠单抗 (clivatuzumab tetraxetan)、CNT0-95、可那木单抗 (conatumumab)、达西珠单抗 (dacetuzumab)、达利珠单抗 (daclizumab)、达雷木单抗 (daratumumab)、地莫单抗 (detumomab)、依美昔单抗 (ecromeximab)、厄妥索单抗 (ertumaxomab)、依决洛单抗 (edrecolomab)、依法利珠单抗 (efalizumab)、埃罗妥珠单抗 (elotuzumab)、PEG化恩莫单抗 (enlimomab pegol)、西依匹莫单抗 (epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗 (epratuzumab)、厄利珠单抗 (erlizumab)、埃达珠单抗 (etaracizumab)、法索单抗 (fanolesomab)、法拉莫单抗 (faralimomab)、法勒珠单抗 (farletuzumab)、芬妥木单抗 (figitumumab)、加利昔单抗 (galiximab)、加维莫单抗 (gavilimomab)、吉妥单抗 (gemtuzumab ozogamicin)、维汀-格仑妥木单抗、戈利昔单抗 (gomiliximab)、伊巴利珠单抗 (ibalizumab)、替伊莫单抗 (ibrutumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗 (igovomab)、英妥木单抗 (intetumumab)、伊妥木单抗 (iratumumab)、伊诺莫单抗 (inolimomab)、奥英妥珠单抗 (inotuzumab ozogamicin)、伊匹木单抗 (ipilimumab)、凯利昔单抗 (keliximab)、拉贝珠单抗 (labetuzumab)、林妥珠单抗 (lintuzumab)、来沙木单抗 (lexatumumab)、鲁卡木单抗 (lucatumumab)、鲁昔单抗 (lumiliximab)、马帕木单抗 (mapatumumab)、马司莫单抗 (maslimomab)、马妥珠单抗 (matuzumab)、米拉妥珠单抗 (milatuzumab)、明瑞莫单抗 (minretumomab)、米妥莫单抗 (mitumomab)、莫罗单抗 (muromonab)-CD3、他那莫单抗 (naptumomab estafenatox)、那他株单抗 (natalizumab)、耐昔妥珠单抗 (necitumumab)、奥瑞珠单抗 (ocrelizumab)、奥度莫单抗 (odulimomab)、奥法木单抗 (ofatumumab)、奥拉单抗 (olaratumab)、莫奥珠单抗 (oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗 (oregovomab)、奥昔珠单抗 (otelixizumab)、帕尼单抗 (panitumumab)、帕妥珠单抗 (pertuzumab)、喷妥莫单抗 (pemtumomab)、普立昔单抗 (priliximab)、PRO 140、尼妥珠单抗 (nimotuzumab)、罗妥木单抗 (robatumumab)、利妥昔单抗 (rituximab)、罗维珠单抗 (rovelizumab)、鲁利单抗 (ruplizumab)、沙妥莫单抗喷地肽 (satumomab pendetide)、西利珠单抗 (siplizumab)、索土珠单抗 (sontuzumab)、他多赛珠单抗 (tadocizumab)、帕他普莫单抗 (taplitumomab paptox)、替奈昔单抗 (teneliximab)、特普利珠单抗 (teplizumab)、TGN1412、替西木单抗 (ticilimumab) (=曲美木单抗 (tremelimumab))、替加珠单抗 (tigatuzumab)、托西珠单抗 (tocilizumab) (=atlizumab)、托利珠单抗 (toralizumab)、托西莫单抗 (tositumomab)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、曲美木单抗 (tremelimumab)、妥考妥珠单抗、维多株单抗 (vedolizumab)、维妥珠单抗 (veltuzumab)、维西珠单抗 (visilizumab)、vitaxin、伏洛昔单抗 (volociximab)、伏妥莫单抗 (votumumab)、扎鲁木单抗 (zalutumumab)、扎木单抗 (zanolimumab)、齐拉木单抗 (ziralimumab)、阿佐莫单抗 (zolimumab aritox)、阿特殊单抗 (Atezolizumab)、贝伐珠单抗 (bevacizumab) (**Avastin®**)、地诺单抗 (denosumab)、地努图希单抗 (dinutuximab)、纳武单抗 (nivolumab)、奥滨尤妥珠单抗 (obinutuzumab)、派姆单抗 (pembrolizumab)、皮地利珠单抗 (pidilizumab) (CT-011)、雷莫芦单抗 (ramucirumab)、司妥昔单抗 (siltuximab)、曲妥珠单抗-美坦新偶联物 (ado-trastuzumab emtansine)、CEA-scan Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C、MEDI4736、或其抗原结合片段。

[0641] 74. 实施方案9-73中任一项的细胞表面缀合物, 其中所述参考细胞表面分子是参

考EGFR,并且所述经修饰的细胞表面分子是经修饰的EGFR。

[0642] 75.实施方案74的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR包含由西妥昔单抗或其抗原结合片段特异性识别的表位。

[0643] 76.实施方案74或实施方案75的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR缺乏所述参考EGFR的EGFR结构域I、EGFR结构域II、EGFR近膜结构域和EGFR酪氨酸激酶结构域中的一个或多个。

[0644] 77.实施方案74-76中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR缺乏所述参考EGFR的EGFR结构域I、EGFR结构域II、EGFR近膜结构域和EGFR酪氨酸激酶结构域中的全部结构域。

[0645] 78.实施方案74-77中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR包含细胞外结构域,所述细胞外结构域由所述参考EGFR的亚结构域III和亚结构域IV组成或基本上由其组成。

[0646] 79.实施方案74-78中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的EGFR包含在SEQ ID NO:44或46中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:44或46至少或至少约85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。

[0647] 80.实施方案9-73中任一项的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是参考HER2,并且所述经修饰的细胞表面分子是经修饰的HER2。

[0648] 81.实施方案80的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2包含由曲妥珠单抗或其抗原结合片段特异性识别的表位。

[0649] 82.实施方案80或实施方案81的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2缺乏所述参考HER2的HER2结构域I、HER2结构域II、HER2结构域III中的一个或多个。

[0650] 83.实施方案80-82中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2缺乏所述参考HER2的HER2结构域I、HER2结构域II和HER2结构域III中的全部结构域。

[0651] 84.实施方案80-83中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2包含细胞外结构域,所述细胞外结构域由所述参考HER2的结构域IV组成或基本上由其组成。

[0652] 85.实施方案80-84中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的HER2包含在SEQ ID NO:92中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:92至少或至少约85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。

[0653] 86.实施方案9-72中任一项的细胞表面缀合物,其中所述参考细胞表面分子是参考PSMA,并且所述经修饰的细胞表面分子是经修饰的PSMA。

[0654] 87.实施方案86的细胞表面缀合物,其中所述参考PSMA是野生型PSMA,任选地野生型人PSMA。

[0655] 88.实施方案87的细胞表面缀合物,其中所述参考PSMA是人PSMA和/或包含SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:96或97中所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0656] 89.实施方案86-88中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的PSMA包含所述参考PSMA的细胞外部分和跨膜结构域。

[0657] 90.实施方案86-89中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考PSMA相比,所述经修饰的PSMA在所述细胞内区域中包含一个或多个氨基酸修饰。

- [0658] 91. 实施方案86-90中任一项的细胞表面缀合物,其中所述一个或多个氨基酸修饰包含一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。
- [0659] 92. 实施方案86-91中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考PSMA相比,所述经修饰的PSMA展现改变的细胞内化。
- [0660] 93. 实施方案86-92中任一项的细胞表面缀合物,其中参考在SEQ ID NO:94中所示的氨基酸序列中的位置,所述经修饰的PSMA包含与W2G对应的氨基酸取代或者不包含W2或者不包含在位置2处的任何残基。
- [0661] 94. 实施方案86-93中任一项的细胞表面缀合物,其中与所述参考PSMA相比,所述经修饰的PSMA包含11个N末端氨基酸的缺失或截短。
- [0662] 95. 实施方案86-94中任一项的细胞表面缀合物,其中所述经修饰的PSMA包含能够由抗体或其抗原结合片段识别的表位。
- [0663] 96. 实施方案95的细胞表面缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段选自J591、DF0-J591、CYT-356、J415、3/A12、3/F11、3/E7、D2B、107-1A4、YPSMA-1、YPSMA-2、3E6、2G7、24.4E6、GCP-02、GCP-04、GCP-05、J533、E99、1G9、3C6、4.40、026、D7-Fc、D7-CH3、4D4、A5、及其抗原结合片段。
- [0664] 97. 实施方案1-96中任一项的细胞表面缀合物,其中所述细胞表面缀合物不是免疫原性的和/或在给予它的受试者中不诱导免疫应答。
- [0665] 98. 一种多核苷酸,其包含编码实施方案1-97中任一项的细胞表面缀合物的核酸序列。
- [0666] 99. 实施方案98的多核苷酸,其中所述核酸序列进一步包含信号序列。
- [0667] 100. 实施方案99的多核苷酸,其中所述信号序列编码源自GMCSFR $\alpha$ 链的信号肽。
- [0668] 101. 实施方案98-100中任一项的多核苷酸,其中所述核酸序列是第一核酸序列,并且所述多核苷酸进一步包含编码重组受体的第二核酸序列。
- [0669] 102. 实施方案101的多核苷酸,其中所述重组受体是或包含嵌合抗原受体(CAR)。
- [0670] 103. 实施方案101或实施方案102的多核苷酸,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列被内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分开,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。
- [0671] 104. 实施方案101-103中任一项的多核苷酸,其中所述第一核酸序列在所述第二核酸序列的上游。
- [0672] 105. 实施方案101-103中任一项的多核苷酸,其中所述第一核酸序列在所述第二核酸序列的下游。
- [0673] 106. 一种载体,其包含实施方案98-105中任一项的多核苷酸。
- [0674] 107. 实施方案106的载体,其是病毒载体。
- [0675] 108. 实施方案106或实施方案107的载体,其是逆转录病毒载体。
- [0676] 109. 实施方案106-108中任一项的载体,其是慢病毒载体或 $\gamma$ 逆转录病毒载体。
- [0677] 110. 一种产生工程化细胞的方法,所述方法包括将实施方案96-105中任一项的多核苷酸或实施方案106-109中任一项的载体引入细胞中。
- [0678] 111. 一种工程化细胞,其通过实施方案110的方法产生。
- [0679] 112. 一种工程化细胞,其包含实施方案98-105中任一项的多核苷酸或实施方案

106-109中任一项的载体。

[0680] 113.一种工程化细胞,其包含实施方案1-97中任一项的细胞表面缀合物。

[0681] 114.实施方案113的工程化细胞,其进一步包含重组受体。

[0682] 115.实施方案114的工程化细胞,其中所述重组受体能够结合靶抗原,所述靶抗原与疾病或障碍的细胞或组织相关、对疾病或障碍的细胞或组织是特异的和/或在疾病或障碍的细胞或组织上表达。

[0683] 116.实施方案115的工程化细胞,其中所述疾病或障碍是感染性疾病或障碍、自身免疫性疾病、炎性疾病、或肿瘤或癌症。

[0684] 117.实施方案115或实施方案116的工程化细胞,其中所述靶抗原是肿瘤抗原。

[0685] 118.实施方案115-117中任一项的工程化细胞,其中所述靶抗原选自 $\alpha v\beta 6$ 整合素( $\alpha v\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CC基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、III型表皮生长因子受体突变(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 $\alpha$ 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 $\alpha$ (IL-22Ra)、IL-13受体 $\alpha 2$ (IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 $\kappa$ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、天然杀伤组2成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Wilms肿瘤1(WT-1)。

[0686] 119.实施方案115-118中任一项的工程化细胞,其中所述靶抗原选自ROR1、HER2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha 2$ 、kdr、 $\kappa$ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)和细胞周期蛋白A1(CCNA1)。

[0687] 120.实施方案114-119中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。

[0688] 121.实施方案114-120中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体是嵌合抗原受

体 (CAR)。

[0689] 122. 实施方案114-121中任一项的工程化细胞, 其中所述重组受体包含含有抗原结合结构域的细胞外部分。

[0690] 123. 实施方案122的工程化细胞, 其中所述抗原结合结构域是或包含抗体或抗体片段。

[0691] 124. 实施方案123的工程化细胞, 其中所述抗体片段是单链片段。

[0692] 125. 实施方案123或实施方案124的工程化细胞, 其中所述片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。

[0693] 126. 实施方案123-125中任一项的工程化细胞, 其中所述片段包含scFv。

[0694] 127. 实施方案114-126中任一项的工程化细胞, 其中所述重组受体包含细胞内信号传导区域。

[0695] 128. 实施方案127的工程化细胞, 其中所述细胞内信号传导区域包含细胞内信号传导结构域。

[0696] 129. 实施方案128的工程化细胞, 其中所述细胞内信号传导结构域是或包含主要信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体 (TCR) 组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导结构域。

[0697] 130. 实施方案128或实施方案129的工程化细胞, 其中所述细胞内信号传导结构域是或包含CD3链的细胞内信号传导结构域, 任选地CD3-zeta (CD3 $\zeta$ ) 链或其信号传导部分。

[0698] 131. 实施方案127-130中任一项的工程化细胞, 其进一步包含设置在所述细胞外结构域与所述细胞内信号传导区域之间的跨膜结构域。

[0699] 132. 实施方案127-131中任一项的工程化细胞, 其中所述细胞内信号传导区域进一步包含共刺激信号传导结构域。

[0700] 133. 实施方案132的工程化细胞, 其中所述共刺激信号传导结构域包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

[0701] 134. 实施方案132或实施方案133的工程化细胞, 其中所述共刺激信号传导结构域包含CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

[0702] 135. 实施方案132-134中任一项的工程化细胞, 其中所述共刺激信号传导结构域位于所述跨膜结构域与所述细胞内信号传导结构域之间。

[0703] 136. 实施方案111-135中任一项的工程化细胞, 其中所述细胞是免疫细胞。

[0704] 137. 实施方案136的工程化细胞, 其中所述细胞是淋巴细胞。

[0705] 138. 实施方案111至137中任一项的工程化细胞, 其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

[0706] 139. 实施方案138的工程化细胞, 其中所述细胞是T细胞, 所述T细胞是CD8+T细胞或CD4+T细胞。

[0707] 140. 一种组合物, 其包含实施方案111-139中任一项的工程化细胞。

[0708] 141. 实施方案140的组合物, 其进一步包含药学上可接受的赋形剂。

[0709] 142. 一种治疗方法, 其包括将实施方案111-139中任一项的工程化细胞或实施方案140或实施方案141的组合物给予至患有疾病或障碍的受试者。

[0710] 143. 实施方案142的方法, 其中所述疾病或障碍是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或



障碍、或感染性疾病。

[0711] 144. 实施方案142或实施方案143的方法,其进一步包括向所述受试者给予结合分子,所述结合分子能够识别在所述工程化细胞上表达的所述细胞表面缀合物的所述药剂;并且检测表达所述细胞表面缀合物的细胞。

[0712] 145. 实施方案144的方法,其中检测包括体内成像。

[0713] 146. 一种鉴定表达细胞表面缀合物的细胞的方法,所述方法包括使包含表达或可能表达实施方案1-97中任一项的细胞表面缀合物的细胞或实施方案111-139中任一项的工程化细胞的组合物、或实施方案140或实施方案141的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的所述药剂的结合分子接触。

[0714] 147. 实施方案146的方法,其在体外、离体或在体内进行。

[0715] 148. 实施方案146或实施方案147中任一项的方法,其中经由体内成像来检测表达所述细胞表面分子的所述细胞。

[0716] 149. 实施方案145或实施方案148的方法,其中所述体内成像方法选自磁共振成像(MRI)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、计算机断层扫描(CT)、计算机轴向断层扫描(CAT)、电子束计算机断层扫描(EBCT)、高分辨率计算机断层扫描(HRCT)、内摆线断层扫描、正电子发射断层扫描(PET)、闪烁扫描、 $\gamma$ 照相机、 $\beta^+$ 检测器、 $\gamma$ 检测器、荧光成像、低光成像、X射线和生物发光成像。

[0717] 150. 实施方案145、实施方案148或实施方案149的方法,其中所述结合分子与提供信号或诱导在体内可检测的信号的部分缀合。

[0718] 151. 实施方案150的方法,其中所述部分是放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物或酶。

[0719] 152. 一种鉴定用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括:

[0720] (a) 使得用编码所述细胞表面缀合物的实施方案98-105中任一项的多核苷酸或实施方案106-109中任一项的载体转导的组合物、或实施方案111-139中任一项的工程化细胞、或实施方案140或实施方案141的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触;并且

[0721] (b) 鉴定与所述结合分子结合的细胞。

[0722] 153. 一种鉴定用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括:

[0723] (a) 将编码所述细胞表面缀合物的实施方案98-105中任一项的多核苷酸或实施方案106-109中任一项的载体引入细胞中;

[0724] (b) 使包含(a)的所述细胞的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的所述药剂的结合分子接触;并且

[0725] (c) 鉴定所述组合物的与所述结合分子结合的细胞。

[0726] 154. 一种选择用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括:

[0727] (a) 使得用编码所述细胞表面缀合物的实施方案98-105中任一项的多核苷酸或实施方案106-109中任一项的载体转导的组合物、或实施方案111-139中任一项的工程化细胞、或实施方案140或实施方案141的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的药剂的结合分子接触;并且

[0728] (b) 分离与所述结合分子结合的细胞。

[0729] 155.一种选择用细胞表面缀合物转导的细胞的方法,所述方法包括:

[0730] (a)将编码所述细胞表面缀合物的实施方案98-105中任一项的多核苷酸或实施方案106-109中任一项的载体引入细胞中;

[0731] (b)使包含(a)的所述细胞的组合物与能够识别所述细胞表面缀合物的所述药剂的结合分子接触;并且

[0732] (c)分离所述组合物的与所述结合分子结合的细胞。

[0733] 156.实施方案154或实施方案155的方法,其中所述结合分子与可检测部分缀合或能够产生可检测的信号。

[0734] 157.实施方案156的方法,其中所述可检测部分包含荧光蛋白。

[0735] 158.实施方案144-157中任一项的方法,其中所述药剂是链霉亲和素结合肽。

[0736] 159.实施方案158的方法,其中所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。

[0737] 160.实施方案159的方法,其中所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0738] 161.实施方案144-160中任一项的方法,其中所述结合分子是能够可逆地结合所述药剂和/或能够在竞争物质的存在下被竞争的试剂。

[0739] 162.实施方案161的方法,其中所述试剂是链霉亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白。

[0740] 163.实施方案162的方法,其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与位置44至47对应的序列位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。

[0741] 164.实施方案162或实施方案163的方法,其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

[0742] a)在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列;

[0743] b)如下氨基酸序列,所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂;或

[0744] c) a)或b)的功能片段,所述功能片段结合所述药剂。

[0745] 165.实施方案163或实施方案164的方法,其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置,在与117、120和/或121对应的位置处,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步包含一个或多个氨基酸置换。

[0746] 166.实施方案165的方法,其中:

[0747] 所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>;或

- [0748] 所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一个或多个；或
- [0749] 所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。
- [0750] 167. 实施方案162-166中任一项的方法，其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含：
- [0751] a) 在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列；
- [0752] b) 如下氨基酸序列，所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂；或
- [0753] c) a) 或b) 的功能片段，所述功能片段结合所述药剂。
- [0754] 168. 实施方案161-167中任一项的方法，其进一步包括破坏所述结合分子与所述药剂的可逆结合。
- [0755] 169. 实施方案168的方法，其中所述破坏包括使所述细胞与包含能够逆转所述结合分子与所述药剂之间的键的竞争物质的组合物接触。
- [0756] 170. 实施方案169的方法，其中所述竞争物质是游离结合配偶体和/或是竞争剂。
- [0757] 171. 实施方案169或实施方案170的方法，其中所述竞争物质是或包含生物素、生物素类似物或其生物活性片段。
- [0758] 172. 实施方案144-171中任一项的方法，其中所述结合分子是特异性结合所述药剂的抗体或抗原结合片段。
- [0759] 173. 实施方案172的方法，其中所述结合分子是抗Strep标签抗体。
- [0760] 174. 一种分子，其包含与细胞毒性剂缀合的链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白。
- [0761] 175. 实施方案174的分子，其包含链霉亲和素类似物或突变蛋白。
- [0762] 176. 实施方案174或实施方案175的分子，其中所述链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白与链霉亲和素结合肽结合。
- [0763] 177. 实施方案176的分子，其中所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8) 或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:7)。
- [0764] 178. 实施方案176或实施方案177的分子，其中所述链霉亲和素结合肽是或包含序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。
- [0765] 179. 实施方案176-178中任一项的分子，其中所述链霉亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白展现平衡解离常数(K<sub>D</sub>)为从或从约10<sup>-4</sup>M至或至约10<sup>-10</sup>M的对所述链霉亲和素结合肽的结合亲和力。
- [0766] 180. 实施方案174-179中任一项的分子，其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置，在与位置44至47对应的序列位置处，所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>。

[0767] 181. 实施方案174-180中任一项的分子, 其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

[0768] a) 在SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个中所示的氨基酸序列;

[0769] b) 如下氨基酸序列, 所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:3-6、27和28中任一个至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂; 或

[0770] c) a) 或b) 的功能片段, 所述功能片段结合所述链霉亲和素结合肽。

[0771] 182. 实施方案180或实施方案181的分子, 其中参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置, 在与117、120和/或121对应的位置处, 所述链霉亲和素类似物或突变蛋白进一步包含一个或多个氨基酸置换。

[0772] 183. 实施方案182的分子, 其中:

[0773] 所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Asp<sup>117</sup>、Arg<sup>117</sup>、Ser<sup>120</sup>、Ala<sup>120</sup>、Gly<sup>120</sup>、Trp<sup>121</sup>、Tyr<sup>121</sup>或Phe<sup>121</sup>; 或

[0774] 所述一个或多个氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>中的一个或多个; 或

[0775] 所述氨基酸置换选自Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>或Tyr<sup>121</sup>。

[0776] 184. 实施方案174-183中任一项的分子, 其中所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含:

[0777] a) 在SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;

[0778] b) 如下氨基酸序列, 所述氨基酸序列展现与SEQ ID NO:27或28至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且含有与Val<sup>44</sup>、Thr<sup>45</sup>、Ala<sup>46</sup>、Arg<sup>47</sup>、Glu<sup>117</sup>、Gly<sup>120</sup>和Tyr<sup>121</sup>对应的氨基酸序列并且可逆地结合所述药剂; 或

[0779] c) a) 或b) 的功能片段, 所述功能片段可逆地结合所述链霉亲和素结合肽。

[0780] 185. 实施方案174-184中任一项的分子, 其中所述细胞毒性剂是毒素。

[0781] 186. 实施方案185的分子, 其中所述毒素是肽毒素、蓖麻毒素A链毒素、相思豆毒素A链、白喉毒素(DT) A链、假单胞菌外毒素、志贺毒素A链、白树毒素、苦瓜毒蛋白(Momordin)、美洲商陆抗病毒蛋白、皂草素、天花粉蛋白或大麦毒素。

[0782] 187. 实施方案185的分子, 其中所述毒素是光毒素。

[0783] 188. 一种杀伤细胞的方法, 所述方法包括将实施方案174-187中任一项的分子给予至先前给予过实施方案111-139中任一项的细胞、或实施方案140或实施方案141的组合物的受试者。

[0784] 189. 实施方案188的方法, 其中在所述受试者展现与所给予的细胞相关的毒性结果的时候或在所述受试者展现针对所给予的细胞的可检测的和/或细胞介导的免疫应答的时候给予所述分子。

[0785] 190. 实施方案189的方法, 其中所述毒性结果与神经毒性或细胞因子释放综合征(CRS) 相关。

[0786] 本发明不限于本文所公开的实施方案的范围, 所述实施方案旨在作为本发明的各个方面的单个说明, 并且在功能上等同的任何实施方案都在本发明的范围内。除了本文描

述的那些之外,对本发明的组合物和方法的各种修改对于本领域技术人员而言从前面的描述和传授中将变得清楚,并且类似地旨在落入本发明的范围内。在不偏离本发明的真实范围和精神的情况下,可以实施此类修改或其他实施方案。

[0787] 序列

[0788]

SEQ ID	序列	描述
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAES RYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARI NTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDA VQQ	链霉亲和素 物种: 阿维丁链霉菌 (Streptomyces avidinii) UniProt 编号 P22629
2	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPA TDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEA NAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	最小链霉亲和素 物种: 阿维丁链霉菌 (Streptomyces avidinii)
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAES RYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARI NTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDA VQQ	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种: 阿维丁链霉菌 (Streptomyces avidinii)
4	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPA TDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEA NAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种: 阿维丁链霉菌 (Streptomyces avidinii)
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYIGARGNAES	突变蛋白链霉亲和素

[0789]

	RYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARIN NTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDA VQQ	素  Ile44-Gly45-Ala-46 -Arg47  物种：阿维丁链霉 菌（Streptomyces avidinii）
6	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY <b>IGARG</b> NAESRYVLTGRYDSAPA TDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEA NAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和 素  Ile44-Gly45-Ala-46 -Arg47  物种：阿维丁链霉 菌（Streptomyces avidinii）
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	链霉亲和素结合 肽，Strep-标签®
8	WSHPQFEK	Strep-标签® II
9	His-Pro-Baa	链霉亲和素结合肽  Baa选自谷氨酰胺、 天冬酰胺和甲硫氨 酸
10	His-Pro-Gln-Phe	链霉亲和素结合肽
11	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	链霉亲和素结合肽  Oaa是Trp、Lys或 Arg； Xaa是任何氨基酸； Yaa是Gly或Glu Zaa是Gly、Lys或

[0790]

		Arg
12	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	链霉亲和素结合肽  Xaa是任何氨基酸; Yaa是Gly或Glu Zaa是Gly、Lys或Arg
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) <sub>n</sub> -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	链霉亲和素结合肽的顺序模块  Xaa是任何氨基酸; n是8或12
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) <sub>n</sub> -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	链霉亲和素结合肽的顺序模块  n是2或3
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK	双-Strep-标签
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	双-Strep-标签
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK	双-Strep-标签
18	WSHPQFEKGGGSGGGWSHPQFEK	双-Strep-标签
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	双-Strep-标签
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA-标签
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-标签
22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV-标签
23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	T7表位
24	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	HSV表位
25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Myc表位
26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5-标签
27	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPA	突变蛋白链霉亲和

[0791]

	TDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEE NAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	素 Val44-Thr45-Ala46 -Arg47和 Glu117、 Gly120、Try121(突 变蛋白m1-9)  物种: 阿维丁链霉 菌 (Streptomyces avidinii)
28	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAES RYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARI NTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和 素 Val44-Thr45-Ala46 -Arg47和 Glu117、 Gly120、Try121(突 变蛋白m1-9)  物种: 阿维丁链霉 菌 (Streptomyces avidinii)
29	AMQVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTTFGVHWVRQSPGKGLEWLGV IWASGITDYNVPFMSRLSITKDNSKSQVFFKLNSLQPDDETAIYYCAKNDPGT GFAYWGQGTLLVTVSAGSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCGSAWSPQFEKGGGSGGGSGGSAWSPQFEK	Fab 片段 m13B8.2 的可变重链
30	AMDIQMTQSPASLSASVGETVFTFCRASEMIYSYLAWYQQKQKSPQLLVHD AKTLAEGVPSRFSGGSGTQFSLKINTLQPEDFGTYTCQAHYGNPPTFGGGT KLEIKRGIAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGECGS	Fab 片段 m13B8.2 的可变轻链
31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr	抗 CD3 抗体 OKT3 的可变重链



[0792]

	Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	抗CD3抗体OKT3 的可变轻链
33	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	抗 CD28 抗体 CD28.3 的可变重 链
34	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe	抗 CD28 抗体 CD28.3 的可变轻 链

[0793]

	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
35	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	CD3ζ 智人
36	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	CD3ζ 智人
37	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	CD3ζ 智人
38	ESKYGPPCPPCP	间隔子(IgG4铰链) (aa) 智人
39	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	间隔子(IgG4铰链) (nt) 智人
40	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLGLK	铰链-CH3间隔子 智人
41	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYF SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLK	铰链-CH2-CH3 间 隔子 智人
42	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEE QEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHL TWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHP SLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILL MWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVS HEDSRILLNASRSLEVSIVTDH	IgD-铰链-Fc 智人
43	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A

[0794]

		人工的
44	MLLIVTSLLLCELPHPAFLLIIPKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRT DLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNK NLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWGE PRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPN CTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR 人工的
45	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcat tcctcctgatccacgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaa agactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacc tccatcagtgccgatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactcct tcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgt aaaggaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacg gacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgccgcaggaccaagcaac atggtcagttttctcttgctgcagtcgagcctgaacataacatccttgggatt acgctccctcaaggagataagtgtgagatgtgataatttcaggaaacaaa aatttgtgctatgcaaatacaataaaactggaaaaaactgtttgggacctccg gtcagaaaacaaaattataagcaacagagggtgaaaacagctgcaaggccac aggccaggctctgccatgccttgtgctccccgagggtgctggggcccgag cccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtgg acaagtgaaccttctggagggtgagccaaggagtttgtggagaactctga gtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgc acaggacggggaccagagacaactgtatccagtgtgccactacattgacggcc cccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcagggagaaaacaacacct ggtctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaac tgcacctacggatgcactgggcccaggctctgaaggctgtccaacgaatgggc ctaagatcccgctccatcgccactgggatggtggggccctcctcttgctgct ggtggtggccctggggatcggcctcttcctg	tEGFR 人工的
46	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFS	tEGFR 人工的

[0795]

	LAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTK IISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNL LEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVK TCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPS IATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	
47	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcat tcctcctgatccca	GMCSFRα 链信号 序列  智人
48	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFRα 链信号 序列  智人  UniProt 编 号 P15509
49	LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDL SFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDAN KTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDF QNHLGSCQKCDPSPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCC HNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCFPLMLYNPTTYQMDVNPEGK YSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKV CNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLD PQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAV VSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEG EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIAT GMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTLRLRLQERELVEPLTPSGEAPN QALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATS PKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVRE HKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDF	HER1/ErbB1/EGF R全长（成熟）  跨膜结构域： 氨基酸622-644  细胞质结构域：氨 基酸645-1186  智人  UniProt 编 号 P00533

[0796]

	<p>GLAKLLGAEKEYHAEGGKVPIKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELM</p> <p>TFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPK</p> <p>FRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVD</p> <p>ADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDS</p> <p>FLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLN</p> <p>PAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAKGSHQISLD</p> <p>NPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRLVAPQSSEFIGA</p>	
50	<p>TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMRLRHLYQGCVVQGNLELTYLPTNASLSFL</p> <p>QDIQEVQGYVLIHNVQRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNT</p> <p>TPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQ</p> <p>LALTLDITNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGP</p> <p>LPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESM</p> <p>PNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKC</p> <p>SKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGPA</p> <p>SNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFNQLQVIRGRILHN</p> <p>GAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTVPWDQLFRNPH</p> <p>QALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVE</p> <p>ECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCACAHYKDPP</p> <p>FCVARCPSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQ</p> <p>RASPLTSIIISAVVIGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVE</p> <p>PLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPV</p> <p>AIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMP</p> <p>YGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMIKAGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVK</p> <p>SPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVPIKWMALLESILRRRFTHQSDVW</p> <p>SYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKC</p> <p>WMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLE</p> <p>DDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRSSSTRSGGGDLTLG</p> <p>LEPSEEEAPRSLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSE</p> <p>DPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGAT</p> <p>LERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGAAPQPHPPAFSPAFD</p> <p>NLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV</p>	<p>HER2/neu/ErbB2全 长（成熟）</p> <p>跨膜结构域： 氨基酸631-653</p> <p>细胞质结构域：氨 基酸654-1233</p> <p>智人</p> <p>UniProt 编 号 P04626</p>

[0797]

51	<p>SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGAENQYQTLTKLYERCEVVMGNLEIVLTGHN ADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNY NTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIV VKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCC HDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDGACVPRCPQPLVYNKLTFTQLEPNPHTK YQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLMCEPCGGLCPKAC EGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEK LNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVSFSLNTTIGGRSLYNRGFSLLIMKN LNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTEERLDIKHN RPRRDCVAEGKVCPLCSSGGCWGPQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGE PREFAEAEFCFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPH GVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPQLQDCLGQTLVLIGKTHLT MALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEK ANKVLARIFKETELRKLKVLGSGVFGTVHKGWVIEGESIKIPVCIKVEDK SGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHIVRLLGLCPGSSLQVLTQYLPLGSLLDHV RQHRGALGPQLLLNWGVQIAKGMYYLEEHGMVHRNLAARNVLLKSPSQVQVA DFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKWMALESIHFQKQYTHQSDVWSYGVTVWE LMTFGAEPYAGRLAEVDPDLLEKGERLAQPQICTIDVYVMVVKCWMIDENIR PTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPEPHGLTNKKLEEVELEP ELDLDDLLEAEEDNLATTTLSALSPLVGTNLNRPRGSQSLLSPSSGYMPMNQ GNLGESCQESAVSGSSERCPRPVSLHPMPRGCLASESSEGHVTGSEAELEQEK VSMCRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSLTPVTPLSPGLEEEDVNGYVMPD THLKGTPSSREGTLSSVGLSSVLGTEEEDEDEEYEMNRRRRHSPPHPPRPS SLEELGYEYMDVGSDDLASLSTQSCPLHPVPIMPTAGTTPDEDYEYMNQRQ DGGGPGGDYAAMGACPAEQGYEEMRAFGQPGHQAPHVHYARLKTLSLEAT DSAFDNPDYWHSRLFPKANAQRT</p>	<p>HER3/ErbB3 全长 (成熟)</p> <p>跨膜结构域: 氨基酸625-645</p> <p>细胞质结构域: 氨基酸646-1323</p> <p>智人</p> <p>UniProt 编号 P21860</p>
52	<p>QSVCACTENKLSLSDLEQQYRALRKYENCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFL RSVREVTGYVLVALNQFRYLPLENLRIIRGTKLYEDRYALAIFLNYRKDGNF GLQELGLKNLTELNGGVYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTN GSSGCGRCHKSTGRCWGPTENHCQTLTRTVCAEQCDGRCYGPYVSDCCHRE CAGGCSGPKDTCFACMNFNDGACVTQCPQTFVYNPTTFQLEHNFNAKYTY</p>	<p>HER4/ErbB4 全长 (成熟)</p> <p>跨膜结构域: 氨基酸627-650</p>

[0798]

	<p>GAFCVKKCPHNFVVDSSSCVRACPSSKMEVEENGIMCKPCTDICPKACDGI GTGSLMSAQTVDDSSNIDKFINCTKINGNLIFLVTGIHGDPYNAIEAIDPEKL NVFRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQG ITSLQFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINWTTLFSTINQRIVIRDNRKA ENCTAEGMVCNHLCSDDGCGWPGPDQCLSCRRFSRGRICIESCNLYDGFEF FENGSI CVECDPQCEKMEDGLLTCHGPGPDNCTKCSHF KDGPNCVEKCPDGL QGANSFIFKYADPDRECHPCHPNCTQGCNGPTSHDCIYYPWTHSTLPQHAR TPLIAAGVIGGLFILVIVGLTFAVYVRRKSIKKRALRRFLETETELVEPLTPS GTAPNQAQLRILKETELKRVKVLGSGAFGT VYKGIWVPEGETVKIPVAIKIL NETTGPKANVEFMDEALIMASMDPHLVRLGVCLSP TIQLVTQLMPHGCLL EYVHEHKDNIGSQLLLNWCVQIAKGMMYLEERRLVHRDLAARNVLVKSPNHV KITDFGLARLLEGEKEYNADGGKMPIKWMALECIHYRKETHQSDVWSYGV IWELMTFGGKPYDGIPTREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYVMVKCWMIDA DSRPKFKELAEEFSRMARDPQRYLVIQGD DRMKLPSPND SKFFQNLLDEEDL EDMMDAEEYLVPQAFNIPPIYTSRARIDSNRSEIGHSPPPAYTPMSGNQFV YRDGGFAAEQGVSVPYRAPSTIPEAPV AQGATAEIFDDSCCNGTLRKP VAP HVQEDSSTQRY SADPTVFAPERSPRGELDEEGYMT PMRD KPKQEY LNPVEEN PFVSRKNGDLQALDNPEYHNASNGPPKA EDEYVNEPLYLNTFANTLGKAEY LKNNILSMPEKAKKAFDNP DYWNHSLPPRSTLQHPDYLQEYSTKYFYKQNGR IRPIVAENPEYLSEFSLKPGTVLPPPPYRHRNTVV</p>	<p>细胞质结构域: 氨基酸651-1283</p> <p>智人</p> <p>UniProt 编号 Q15303</p>
53	<p>ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEE DLQKVAEYKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVD TYDD QLISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSAL GAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYPDPHPLHSISVRRLKETKDGFMLTDQ SYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLD AQT FHTRIIRFCSI NSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNI LQAAYVSKPGAQLARQIGAS LNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFP IKYVNDFFNKIVNKNVRLQH FYGPNHEHC FNRTL LRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLT SISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLD SHPVSP EVIV EHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDK CVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKF</p>	<p>HGFR/c-Met 全长 (成熟)</p> <p>跨膜结构域: 氨基酸909-931</p> <p>细胞质结构域: 氨基酸932-1366</p> <p>智人</p>

[0799]

	<p>DLKKTRVLLGNESCTLTTLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQ</p> <p>YSTFSYVDPVITSISPKYGPAGGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKCTLK</p> <p>SVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYEIHPTKS</p> <p>FISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNETVACQHRNSEIICCTTP</p> <p>SLQQNLNLQPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPFVKPFEPVMISMGNE</p> <p>VLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELN</p> <p>IEWKQAISSTVLGKIVVQPDQNTGLIAGVVSISTALLLLGFFLWLKCRKQ</p> <p>IKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQF</p> <p>PNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPVLQ</p> <p>AVQHVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSINRIT</p> <p>DIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSPLVVLPMKHGDLRNF</p> <p>IRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKV</p> <p>ADFGGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVL</p> <p>LWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRRLQPEYCPDPLYEVMKLCWHPKA</p> <p>EMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNAD</p> <p>DEVDTRPASFWETS</p>	<p>UniProt 编 号</p> <p>P08581</p>
54	<p>MKSGSGGGSPSTLWGLLFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRENC</p> <p>TVIEGYLHILLISKAEDYRSYRFPKLTVITEYLLLFRVAGLESGLDFPNLT</p> <p>VIRGWKLFYNYALVIFEMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVD</p> <p>WSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGDLCPGTMECKPMCEKTTINNEYNYRCWTT</p> <p>NRCQKMCPTCGKRACTENNECCHPECLGSCSAPDNDTACVACRHYYYAGVC</p> <p>VPACPPNTYRFEGWRCVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHDGECMQECPSGFI</p> <p>RNGSQSMYCIPCEGPCPKVCEEKKTIDSVTSAQMLQGCTIFKGNLLINI</p> <p>RRGNNIASLENFMGLIEVVTVGYVKIRHSHALVSLSFLKNLRLILGEEQLEG</p> <p>NYSFYVLDNQNLQQLWDWDHRNLTIKAGKMYFAFNPKLCVSEIYRMEEVTGT</p> <p>KGRQSKGDINTRNNGERASCESDVLHFTSTTTSKNRIIITWHRYRPPDYRDL</p> <p>ISFTVYYKEAPFKNVTEYDGDACGSNSWNMVDVDLPPNKDVEPGILLHGLK</p> <p>PWTQYAVYVKAVTLTMVENDHIRGAKSEILYIRTNASVPSIPLDVLSASNSS</p> <p>SQLIVKWNPPSLPNGNLSYYIVRWQRQPDGYLYRHNYCSKDKIPIRKYADG</p> <p>TIDIEEVTENPKTEVCGGEGKPCACPKTEAEKQAEKEEAERYKVFENFLHN</p> <p>SIFVPRPERKRRDVMQVANTTMSSRSRNTTAADTYNITDPEELETEYPFFES</p>	<p>IGF-1 R 全长 (成熟)</p> <p>跨膜结构域:</p> <p>氨基酸906-929</p> <p>细胞质结构域: 氨基酸930-1337</p> <p>智人</p> <p>UniProt 编 号</p> <p>P08069</p>



[0800]

	RVDNKERTVISNLRPFTLYRIDIHSCNHEAEKLGCSASNFFVARTMPAEGAD DIPGPVTWEPRPENSIFLKWPEPENPNGLILMYEIKYGSQVEDQRECVSRQE YRKYGGAKLNRLNPGNYTARIQATSLSGNGSWTDPVFFYVQAKTGYENFIHL IIALPVAVLLIVGGLVIMLYVFHRKRNNRSLGNGVLYASVNPEYFSAADVYV PDEWEVAREKITMSRELQGSFGMVYEGVAKGVVKDEPETRVAIKTVNEAAS MRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRLLGVSQGPQLVIMELMTRGDLKSYLR SLRPEMENNPVLAPPSLSKMIQMAGEIADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVA EDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGGKLLPVRWMSPESLKDGVTFTTYSVDW SFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLRVFMEGGLLDKPDNCPDMLFELMRMC WQYNPKMRPSFLEIISIKEMEPEPGFREVSFYSEENKLPEPEELDLEPENM ESVPLDPSASSSSLPDRHSGHKAENGGPGVVLVLRASFDERQPYAHMNGG RKNERALPLPQSSTC	
55	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	接头  人工的
56	GGGSGGGGS	接头  人工的
57	cgcaaagtgtgtaacggaataggtatttggtgaatttaaagactcactctcca taaagtctacgaatattaaacacttcaaaaaactgcacctccatcagtggcga tctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcct cctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacag ggtttttgctgattcaggcttgccctgaaaacaggacggacctccatgcctt tgagaacctagaaatcatagcggcaggaccaagcaacatggtcagttttct cttgagctcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaagg agataagtgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgctatgc aaatacaataaactggaaaaaactgttgggacctccggtcagaaaacaaa attataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgcc atgccttgctgctccccgagggctgctggggcccgagcccagggactgcgt ctcttgccggaatgtcagccgaggcaggaatgcgtggacaagtgaacctt ctggaggggtgagccaagggagtttgggagaaactctgagtgcatcacagtgcc	tEGFR  人工的

[0801]

	acccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggacc agacaactgtatccagtgtgccactacattgacggccccactgcgtcaag acctgcccggcaggagtcattgggagaaaacaacacctggtctggaagtacg cagacgcggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatg cactggggcaggctcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtcc atcgccactgggatggtgggggcccctcctcttgetgctggtggtggccctgg ggatcggcctcttcatg	
58	SAWSHPQFEK	链霉亲和素结合 肽, Strep-标签® II  人工的
59	GGSGGGS	接头  人工的
60	GGGS	接头  人工的
61	GGGS	接头  人工的
62	GGGSGGGSGGGGS	接头  人工的
63	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	MAT标签  人工的
64	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQ RMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNL QIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPAL CNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNLHLSGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQ KLTKIICAQQCSGRGRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATC	HER1/ErbB1/EGF R全长 (前体)  信号肽: 氨基酸 1-24

[0802]

	<p>KDTCPPMLLYNPTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNVVTDHGSCVRACG          ADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGIEFKDLSINATNIKHFKNCTS          ISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTD          LHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVVIISGNKN          LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCGWPEP          RDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPRFEVENSECIQCHPECLPQAMNITCT          GRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC          TYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRK          RTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYK          GLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLGI          CLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDNR          LVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVPKWMAL          SILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQP          PICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIIQGD          LPSPTDSNFYRALMDEEDMDVDVDADEYLIPQGGFSSPSTSRTPLLSSLSA          TSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEY          INQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLTNPQ          TCVNSTFDSPAHWAKGSHQISLDNPDYQQDFFPKAKPNGIFKGSTAENAE          YLRVAPQSSEFIGA</p>	<p>细胞外结构域：氨基酸25-645</p> <p>跨膜结构域： 氨基酸646-668</p> <p>细胞质结构域：氨基酸669-1210</p> <p>智人</p> <p>UniProt 编号 P00533</p>
65	<p>MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTMKLRLPASPETHLDMLRHLYQG          CQVVQGNLELTYPNALSFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQRLRIVRG          TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQ          RNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTIDNRSRACHPCSPMCKGSRWGES          SEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNH          SGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYFGASCVTACPYNLSTDVGSCT          LVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEF          AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWP          DSLPDLVSFQNLQVIRGRIHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALI          HHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHC          WGPQPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNG          SVTCFGPEADQCVACAHYKDPFPCVARCPGSKVDPDLSYMPIWKFPDEEGACQ</p>	<p>HER2/neu/ErbB2全长（前体）</p> <p>信号肽：氨基酸1-22</p> <p>细胞外结构域：氨基酸23-652</p> <p>跨膜结构域： 氨基酸653-675</p>

[0803]

	PCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIIISAVVGILLVVVLGVVFGILIK RRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGS GAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSP YVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRLGSGDLLNWCMQIAKG MSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKV PIKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLE KGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSSEFSRMARDPQRFVV IQNEDLGASPLDSTFYRSLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAG GMVHHRHRSSSTRSGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGM GAAKGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPD VRQPFPSPREGPLPAARPAAGATLERPKTLPKNGVVKDVFAFGGAVENPEY LTPQGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEY LGLDVPV	细胞质结构域：氨基酸676-1255  智人  UniProt 编号 P04626
66	MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNQAVCPGTLNGLSVTGAENQYQTLTKL YERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRV VRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLC HMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRGWGPGSEDCQTLTKT ICAPQCNGHCFGNPNQCCHECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCP QPLVYNKLTQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSVVRACPPDKMEV DKNGLKMCEPCGGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFL ITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVERTVREITGYLNIQSWPPMHNFVSFVSNLT TIGGRSLYNRGFSLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSL NWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDDLCSGGCGWGPQCLSC RNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAEAECSCHPECQPMEGTATCNGSGSDT CAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGP ELQDCLGQTLVLIGKTHLTMAITVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRRIQNKRA MRRYLERGESIEPLDPSEKANKVLARIFKETELRKLVLSGVFGTVHKGWV IPEGESIKIPVCIKVEDKSGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHIVRLLGLCPG SSLQLVTQYLPGLSLLDHVRQHRGALGPQLLLNWGVQIAKGMYYLEEHGMVH RNLAARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKWMALESI FGKYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAEPYAGLRRLAEVDPDLLEKGERLAQPQIC	HER3/ErbB3 全长 (前体)  信号肽：氨基酸1-19  细胞外结构域：氨基酸20-643  跨膜结构域：氨基酸644-664  细胞质结构域：氨基酸665-1342  智人  UniProt 编号

[0804]

	<p>TIDVYVMVKCWMIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAP  GPEPHGLTNKKLEEVELEPELDDLDLEAEEDNLATTTLGSALSPLVGTINR  PRGSQSLLSPSSGYMPMNQGNLGESCQESAVSGSSERCPRPVS LHPMPRGCL  ASESSEGHVVTGSEAELOEKVSMCRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSL LTPVT  PLSPPGLEEDVNGYVMPDTHLKGTPSSREGTLSSVGLSSVLGTEEEDEDEE  YEYMNRRRRHSPPHPPRPSSLEELGYEYMDVGSDLSASLGSTQSCPLHPVPI  MPTAGTTPDEDEYEMNRQRDGGGPGGDYAAMGACPASEQGYEEMRAFQGPQH  QAPHVHYARLKTLSLEATDSAFDNPDPYHWSRLFPKANAQRT</p>	P21860
67	<p>MKPATGLWVWVSLVAAGTVQPSDSQSV CAGTENKLSSLS DLEQQYRALRKY  YENCEVVMGNLEITSIEHNRDLSFLRSVREVTGYVLVALNQFRYLPLENLRI  IRGTKLYEDRYALAI FLNRYKDG NFG LQELGLKNL TEILNGGVYVDQNKFLC  YADTIHWQDIVRNPWPSNLTLVSTNGSSGCGRCHK SCTGRCWGPTENHCQTL  TRTVCAEQCDGR CYGPYVSDCCHRECAGGCSGPKD TDCFACMNFND SGACVT  QCPQTFVYNPTTFQLEHNFN AKYTYGAFCVKKCPHNFVVDSSS CVRACPSSK  MEVEENGIMCKPCTDICPKACDGIGTGSLSMAQTVDSSNIDKFINCTKING  NLIFLVTGIHGDPYNAIEAIDPEKLN VFRTVREITGFLNIQSWPPNMTDFSV  FSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITS LQFQSLKEISAGNIYITDNSLCY  YHTINWTTLFSTINQRIVIRDNRAENCTAEGMVCNHLCS SDGCWGPGPDQC  LSCRRFSRGRICIESCNLYDGEFREFENG SICVECDPQCEKMEDGLLTCHGP  GPDNCTKCSHFKDGPNCVEKCPDGLQGANSFIFKYADPDRECHPCHPNCTQG  CNGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPLIAAGVIGGLFILVIVGLTFAYVVR  RKSIKKKRALRRFLET ELVEPLTPSGTAPNQAQLRILKETELKRVKVLGSGA  FGTVYKGIWVPEGETVKIPVAIKILNETTGPKANVEFMDEALIMASMDPHL  VRLGLVCLSP TIQLVTQLMPHGCLLEYVHEHKDNIGSQ LLLNWCVQIAKGMM  YLEERRLVHRDLAARNVLVKS PNHVKITDFGLARLLEGDEKEYNADGGKMPI  KWMALECIHYRKFTHQSDVWSYGV TIWELMTFGGKPYDGIPTREIPDLLEKG  ERLPQPPICTIDVYVMVKCWMIDADSRPKFKELAAEF SRMARDPQRYLVIQ  GDDRMKLPS PND SKFFQNL LDEEDLEDMMDAE EYLVPQAFNIPPIYTSRAR  IDSNRSEIGHSPPPAYTPMSGNQFVYRDGGFAAEQGVSVPYRAPTSTIPEAP  VAQGATAEIFDDSCNGTLRKPVAPHVQEDSSTQRY SADPTVFAPERSPRGE  LDEEGYMTPMRDKPKQEY LNPVEENPFVSRRKNGDLQALDNPEYHNASNGPP</p>	<p>HER4/ErbB4 全长 (前体)</p> <p>信号肽: 氨基酸 1-25</p> <p>细胞外结构域: 氨 基酸26-651</p> <p>跨膜结构域: 氨基酸652-675</p> <p>细胞质结构域: 氨 基酸676-1308</p> <p>智人</p> <p>UniProt 编 号 Q15303</p>

[0805]

	KAEDEYVNEPLYLNTFANTLGKAEYLKNNILSMPEKAKKAFDNDPDYWNHSLP PRSTLQHPDYLQEYSTKYFYKQNGRIRPIVAENPEYLSEFSLKPGTVLPPPP YRHRNTVV	
68	MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPI QNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFCQDCSSK ANLSGGVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQS EVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPD HPLHSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIY FLTQVQRETLDQTFHTRIIRFCSINSGLHSEMPLECILTEKRKKRSTKKE VFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCA FPIKYVNDFNKIVNKNVRCQLQHFYGNHEHCFNRLLRNSSGCEARRDEY RTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVS RSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGC RHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFPNS APLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNLKC TVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLT LTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDL ANRETSIFSYPREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINH EAGRNFVACQHRNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFD LIYVHNPFVKPFKPVMI SMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCEN IHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFGLIA GVVSISTALLLLGFFLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARS VSPTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDS DISSPLLQNTVHIDLALNPELVQAVQHVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCV YHGTLLDNDGKKIHCAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLG ICLRSEGSPVLVLPYMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLA SKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFGGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVK WMALESLOTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGR RLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS	HGFR/c-Met 全长 (前体) 信号肽: 氨基酸 1-24 细胞外结构域: 氨 基酸25-932 跨膜结构域: 氨基酸933-955 细胞质结构域: 氨 基酸956-1390 智人 UniProt 编 号 P08581
69	MKSGSGGGSPTSLWGLLFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRLNC	IGF-1 R 全长 (前

[0806]

	<p>TVIEGYLHILLISKAEDYRSYRFPKLTVITEYLLLFVAGLESGLDLPNLT  VIRGWKLFYNYALVIFEMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVD  WSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGDLCPGTMECKPMCEKTTINNEYNYRCWTT  NRCQKMCPSTCGKRACTENNECCHPECLGSCSAPDNDTACVACRHYYYAGVC  VPACPPNTYRFEGWRCVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHDGECMQECPSGFI  RNGSQSMYCIPCEGPCPKVCEEKKTIDSVTSAQMLQGCTIFKGNLLINI  RRGNNIASELENFMGLIEVVTGYVKIRHSHALVSLFLKNLRLILGEEQLEG  NYSFYVLDNQNLQQLWDWDHRNLTIKAGKMYFAFNPKLCVSEIYRMEEVTGT  KGRQSKGDINTRNNGERASCESDVLHFTSTTTSKNRITITWHRYRPPDYRDL  ISFTVYYKEAPFKNVTEYDGDACGSNSWNMVDVDLPPNKDVEPGILLHGLK  PWTQYAVYVKAUVTMTMENDHIRGAKSEILYIRTNASVPSIPLDVLSASNSS  SQLIVKWNPPSLPNGNLSYYIVRQRPQDGYLYRHNYCSKDKIPIRKYADG  TIDIEEVTENPKTEVCGGEGKPCACPKTEAEKQAEKEEAERYKVFENFLHN  SIFVPRPERKRRDVMQVANTTSSRSRNTTAADTYNITDPEELETEYPFFES  RVDNKERTVISNLRPFTLYRIDIHSCNHEAEKLGCSASNFFVARTMPAEGAD  DIPGPVTWEPRPENSIFLKWPEPENPNGLILMYEIKYGSQVEDQRECVSRQE  YRKYGGAKLNRLNPGNYTARIQATSLSGNGSWTDPVFFYVQAKTGYENFIHL  IIALPVAVLLIVGGLVIMLYVHRKRNNRSLGNGVLYASVNPEYFSAADVYV  PDEWEVAREKITMSRELQGSFGMVYEGVAKGVKDEPETRVAIKTVNEAAS  MRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRLLGVSQGPQLVIMELMTRGDLKSYLR  SLRPEMENNPVLAPPSLSKMIQAGEIADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVA  EDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPELKDGVFTTYSVDW  SFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLRVMEGGLDKPDNCPDMLFELMRMC  WQYNPKMRPSFLEIISSIKEEMEPGFREVSYFYSEENKLPEPEELDLEPENM  ESVPLDPSASSSSLPLPDRHSGHKAENGPGPGVLVLRASFDERQPYAHMNGG  RKNERALPLPQSSTC</p>	<p>体)</p> <p>信号肽: 氨基酸 1-30</p> <p>细胞外结构域: 氨基酸 741-935</p> <p>跨膜结构域: 氨基酸936-959</p> <p>细胞质结构域: 氨基酸 960-1367</p> <p>智人</p> <p>UniProt 编号 P08069</p>
70	ESKYGPCCPPCP	间隔子(IgG4铰链)
71	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	间隔子(IgG4铰链)
72	<p>ESKYGPCCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL  HNHYTQKSLSLGLK</p>	铰链-CH3间隔子

[0807]

73	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLK	铰链-CH2-CH3 间 隔子
74	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKEKEKEE QEERETKTPECPSTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHL TWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHP SLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEASWLLCEVSGFSPPNILL MWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVS HEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-铰链-Fc
75	MALPVTALLLPLALLHA	CD8 $\alpha$ 信号肽
76	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
77	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 ( 登 录 号 P10747 的 氨 基 酸 153-179)
78	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKP FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 ( 登 录 号 P10747 的 氨 基 酸 114-179)
79	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747的氨 基酸180-220)
80	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL到GG)
81	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	4-1BB ( Q07011.1 的氨基酸214-255)
82	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3 $\zeta$
83	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3 $\zeta$
84	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK	CD3 $\zeta$



[0808]

	NPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHGGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	
85	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
86	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
87	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
88	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
89	PGGG- (SGGG) 5-P-, 其中P是脯氨酸, G是甘氨酸, 并且S是丝氨酸	接头
90	GSADDAKKDAAKKDGS	接头
91	TGCCACCCTGAGTGTGAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACCTGTTTTGGACCGG AGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCCCACTATAAGGACCCTCCCTTCTGCGT GGCCCGCTGCCCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACATGCCCATCTGG AAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCCCATCAACTGCACCC ACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCCGCCGAGCAGAGAGCCAG CCCTCTGACGGGTGGAGGAAGCGGAGGTGGCAGCTCCATCATCTCTGCGGTG GTTGGCATTCTGCTGGTCTGTGGTCTTGCGGGTGGTCTTTGGGATCCTCATC	经修饰的 HER2t (nt) (人工的)
92	CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVAHAHYKDPFVCVARCPSGVKPDLSPYMPIW KFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTGGGSGGGSSIISAV VGILLVVVLGVVFGILI	经修饰的 HER2t (aa) (人工的)
93	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCAT TCCTCCTGATCCCATGCCACCCTGAGTGTGAGCCCCAGAATGGCTCAGTGAC CTGTTTTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCCCACTATAAGGAC CCTCCCTTCTGCGTGGCCCCGTGCCCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCT ACATGCCCATCTGGAAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCC CATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCCGCC GAGCAGAGAGCCAGCCCTCTGACGGGTGGAGGAAGCGGAGGTGGCAGCTCCA TCATCTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGCTGGTCTGTGGTCTTGCGGGTGGTCTT TGGGATCCTCATC	具有信号序列的经 修饰的HER2t (nt) 人工的
94	MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNI TPKHNMFALDELKAENIKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFG LDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEPPIPGYENVSD IVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIRYGV	PSMA WT (全长)

[0809]

	<p>FRGNKVKNAGLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQQRGNILN</p> <p>LNGAGDPLTPGYPANNEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGS</p> <p>APPDSSWRGSLKVPYNVGPFGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRG</p> <p>AVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTI</p> <p>LFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP</p> <p>LMYSLVHNLTKEKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGND</p> <p>FEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKY</p> <p>HLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKT</p> <p>YSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFI</p> <p>DPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEV</p> <p>KRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA</p>	
95	<p>MGNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLLGLFGLGFWFIKSSNEATNI</p> <p>TPKHNMKAFDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFG</p> <p>LDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSD</p> <p>IVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKV</p> <p>FRGNKVKNAGLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQQRGNILN</p> <p>LNGAGDPLTPGYPANNEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGS</p> <p>APPDSSWRGSLKVPYNVGPFGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRG</p> <p>AVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTI</p> <p>LFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP</p> <p>LMYSLVHNLTKEKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGND</p> <p>FEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKY</p> <p>HLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKT</p> <p>YSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFI</p> <p>DPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEV</p> <p>KRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA</p>	PSMA W2G (全长)
96	<p>atgtggaatctccttcacgaaaccgactcggtgtggccaccgcgcgccgcc</p> <p>cgcgctggctgtgcgtggggcgctggtgctggcggtggtctctttctcct</p> <p>cggcttctctcttcgggtggtttataaaatcctccaatgaagctactaacatt</p> <p>actccaaagcataatatgaaagcatttttgatgaattgaaagctgagaaca</p> <p>tcaagaagttcttatataattttacacagataccacatttagcaggaacaga</p>	PSMA WT (nt)

[0810]

acaaaactttcagcttgcaaagcaaattcaatcccagtggaagaatttggc  
 ctggattctgttgagctagcacattatgatgtcctgttgctacccaaata  
 agactcatcccaactacatctcaataattaatgaagatggaaatgagatttt  
 caacacatcattatttgaaccacctcctccaggatatgaaaatgtttcggat  
 attgtaccacctttcagtgctttctctcctcaaggaatgccagagggcgatc  
 tagtgatgttaactatgcacgaactgaagacttctttaaattggaacggga  
 catgaaaatcaattgctctgggaaaattgtaattgccagatatgggaaagt  
 ttcagaggaaaataagggttaaaaatgccagctggcaggggccaaaggagtca  
 ttctctactccgacctgctgactactttgctcctgggtgaagtcctatcc  
 agatggttggaatcttctggaggtggtgtccagcgtggaatatcctaaat  
 ctgaatggtgcaggagacctctcacaccaggttaccagcaaataaatatg  
 cttataggcgtggaattgcagaggtggtgttctccaagtattcctgttca  
 tccaattggatactatgatgcacagaagctcctagaaaaatgggtggctca  
 gcaccaccagatagcagctggagaggaagtctcaaagtgccctacaatgttg  
 gacctggctttactggaaactttctacacaaaaagtcaagatgcacatcca  
 ctctaccaatgaagtgacaagaatttacaatgtgataggtactctcagagga  
 gcagtggaaccagacagatatgtcattctgggaggtcaccgggactcatggg  
 tgtttggtggtattgacctcagagtggagcagctggtgttcatgaaattgt  
 gagagctttggaacactgaaaaaggaagggtggagacctagaagaacaatt  
 ttgtttgcaagctgggatgcagaagaatttgggtcttcttggttctactgagt  
 gggcagaggagaattcaagactccttcaagagcgtggcgtggcttatattaa  
 tgctgactcatctatagaaggaaactacactctgagagttgattgtacaccg  
 ctgatgtacagcttggtacacaacctaacaaaagagctgaaaagccctgatg  
 aaggctttgaaggcaaattctctttatgaaagttggactaaaaaagtccttc  
 ccagagttcagtggtcatgccaggataagcaaattgggatctggaaatgat  
 tttgaggtgttctccaacgacttgaattgcttcaggcagagcacggtata  
 ctaaaaattgggaaacaaacaaattcagcggtatccactgtatcacagtgt  
 ctatgaaacatatgagttggtggaaaagttttatgatccaatgtttaaatat  
 cacctcactgtggccaggttcgaggagggtggtgtttgagctagccaatt  
 ccatagtgtcccttttgattgtcgagattatgctgtagttttaagaaagta  
 tgctgacaaaatctacagtatttctatgaaacatccacaggaaatgaagaca

[0811]

	<p>tacagtgtatcatttgattcacttttttctgcagtaaagaattttacagaaa          ttgcttccaagttcagtgagagactccaggactttgacaaaagcaaccaat          agtattaagaatgatgaatgatcaactcatgtttctggaaagagcatttatt          gatccattagggttaccagacaggccttttataggcatgtcatctatgctc          caagcagccacaacaagtatgcaggggagtcattcccaggaatttatgatgc          tctgtttgatattgaaagcaaagtggaaccttccaaggcctggggagaagtg          aagagacagatttatgttgagccttcacagtgcaggcagctgcagagactt          tgagtgaagtagcc</p>	
97	<p>ATGTGGAATCTCCTTCATGAAACAGACTCTGCTGTGGCCACAGCCAGAAGAC          CCAGATGGCTGTGTGCTGGGGCCCTGGTGTGGCTGGTGGCTTCTTCTCCT          GGGCTCCTCTTTGGGTGGTTTATAAAATCCTCCAATGAAGCTACTAACATT          ACTCCAAAGCATAATATGAAAGCATTTTTGGATGAATTGAAAGCTGAGAACA          TCAAGAAGTTCTTATATAATTTACACAGATACCACATTTAGCAGGAACAGA          ACAAACTTTTCAGCTTGCAAAGCAAATCAATCCCAGTGGAAAGAATTGGC          CTGGATTCTGTTGAGCTAGCACATTATGATGTCCTGTTGTCTACCCAAATA          AGACTCATCCCACTACATCTCAATAATTAATGAAGATGGAAATGAGATTTT          CAACACATCATTATTTGAACCACCTCCTCCAGGATATGAAAATGTTTCTGAT          ATTGTACCACCTTTCAGTGCTTCTCTCCTCAAGGAATGCCAGAGGGAGATC          TAGTGTATGTTAACTATGCAAGAACTGAAGACTTCTTTAAATTGGAAAGGGA          CATGAAAATCAATTGCTCTGGGAAAATTGTAATTGCCAGATATGGGAAAGTT          TTCAGAGGAAATAAGGTTAAAAATGCCAGCTGGCAGGGGCCAAAGGAGTCA          TTCTCTACTCTGACCCCTGCTGACTACTTTGCTCCTGGGGTGAAGTCCTATCC          AGATGGTTGGAATCTTCCTGGAGGTGGTGTCCAGAGAGGAAATATCCTAAAT          CTGAATGGTGCAGGAGACCCTCTCACACCAGGTTACCCAGCAAATGAATATG          CTTATAGGAGAGGAATTGCAGAGGCTGTTGGTCTTCCAAGTATTCCTGTTCA          TCCAATTGGATACTATGATGCACAGAAGCTCCTAGAAAAAATGGGTGGCTCA          GCACCACCAGATAGCAGCTGGAGAGGAAGTCTCAAAGTGCCCTACAATGTTG          GACCTGGCTTTACTGGAACTTTTCTACACAAAAAGTCAAGATGCACATCCA          CTCTACCAATGAAGTGACAAGAATTTACAATGTGATAGGTACTCTCAGAGGA          GCAGTGGAAACCAGACAGATATGTCATTCTGGGAGGTACAGGGACTCATGGG          TGTTTGGTGGTATTGACCCCTCAGAGTGGAGCAGCTGTTGTTTCATGAAATTGT</p>	不含CpG的PSMA

[0812]

	<p>GAGGAGCTTTGGAACACTGAAAAAGGAAGGGTGGAGACCTAGAAGAACAATT  TTGTTTGCAGCTGGGATGCAGAAGAATTTGGTCTTCTTGGTTCTACTGAGT  GGGCAGAGGAGAATTCAAGACTCCTTCAAGAGAGGGGAGTGGCTTATATTAA  TGCTGACTCATCTATAGAAGGAACTACACTCTGAGAGTTGATTGTACACCC  CTGATGTACAGCTTGGTACACAACCTAACAAAAGAGCTGAAAAGCCCTGATG  AAGGCTTTGAAGGCAAATCTCTTTATGAAAGTTGGACTAAAAAAGTCCTTC  CCCAGAGTTCAGTGGCATGCCCAGGATAAGCAAATTGGGATCTGGAATGAT  TTTGAGGTGTTCTTCCAAAGACTTGAATTGCTTCAGGCAGAGCAAGGTATA  CTAAAAATTGGGAAACAAACAAATTCAGTGGCTATCCACTGTATCACAGTGT  CTATGAAACATATGAGTTGGTGAAAAAGTTTATGATCCAATGTTTAAATAT  CACCTCACTGTGGCCAGGTTAGAGGAGGGATGGTGTTTGAGCTAGCCAATT  CCATAGTGCTCCCTTTTGATTGTAGAGATTATGCTGTAGTTTTAAGAAAGTA  TGCTGACAAAATCTACAGTATTTCTATGAAACATCCACAGGAAATGAAGACA  TACAGTGTATCATTGATTCACTTTTTTCTGCAGTAAAGAATTTTACAGAAA  TTGCTTCCAAGTTCAGTGAGAGACTCCAGGACTTTGACAAAAGCAACCCAAT  AGTATTAAGAATGATGAATGATCAACTCATGTTTCTGGAAAGAGCATTTATT  GATCCATTAGGGTTACCAGACAGGCCTTTTTATAGGCATGTCATCTATGCTC  CAAGCAGCCACAACAAGTATGCAGGGGAGTCATTCCCAGGAATTTATGATGC  TCTGTTTGATATTGAAAGCAAAGTGGACCCTTCCAAGGCCTGGGGAGAAGTG  AAGAGACAGATTTATGTTGCAGCCTTCACAGTGCAGGCAGCTGCAGAGACTT  TGAGTGAAGTAGCCTAA</p>	
98	PLGLWA	可切割的接头
99	GFLG	接头
100	KLAKLAKKLAKLAK	肽毒素

## 序列表

<110> 朱诺治疗学股份有限公司(Juno Therapeutics GmbH)

洛塔尔·戈尔梅洛斯(Lothar GERMEROTH)

克里斯汀·斯蒂姆贝格尔(Christian STEMBERGER)

<120> 细胞表面缀合物及相关的细胞组合物和方法

<130> 735042002640

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> 62/448,936

<151> 2017-01-20

<160> 100

<170> 用于Windows 4.0版的FastSEQ

<210> 1

<211> 159

<212> PRT

<213> 阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*)

<220>

<223> 链霉亲和素

<300>

<308> UniProt编号P22629

<309> 1991-08-01

<400> 1

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly

35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys

65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp

115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys  
 130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln  
 145 150 155

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> 阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*)

<220>

<223> 最小链霉亲和素

<400> 2

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
 1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser  
 20 25 30

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
 35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
 50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
 65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
 85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
 100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
 115 120 125

<210> 3

<211> 159

<212> PRT

<213> 阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*)

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Val144-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 3

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr  
 20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly

35	40	45
Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val	Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro	
50	55	60
Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys		
65	70	75
Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr		
85	90	95
Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser		
100	105	110
Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp		
115	120	125
Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys		
130	135	140
Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln		
145	150	155

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

<213> 阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白链霉亲和素Val144-Thr45-Ala46-Arg47

&lt;400&gt; 4

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe		
1	5	10
Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr		
20	25	30
Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp		
35	40	45
Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val		
50	55	60
Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser		
65	70	75
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu		
85	90	95
Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val		
100	105	110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser		
115	120	125

&lt;210&gt; 5



&lt;211&gt; 159

&lt;212&gt; PRT

<213> 阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

&lt;400&gt; 5

```

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

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

<213> 阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

&lt;400&gt; 6

```

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
1           5           10           15
Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly
          20           25           30
Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
          35           40           45

```

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
 50 55 60  
 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
 85 90 95  
 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
 115 120 125

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽,Strep-标签

<400> 7

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Strep-标签 II

<400> 8

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽

<220>

<221> 变体

<222> (3) ... (3)

<223> Xaa是Gln、Asp或Met

<400> 9

His Pro Xaa

1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽

<400> 10

His Pro Gln Phe

1

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽

<220>

<221> 变体

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa是Trp、Lys或Arg

<220>

<221> 变体

<222> (2) ... (2)

<223> Xaa是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (7) ... (7)

<223> Xaa是Gly或Glu

<220>

<221> 变体

<222> (8) ... (8)

<223> Xaa是Gly、Lys或Arg

<400> 11

Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1

5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽

<220>

<221> 变体

<222> (2) ... (2)

<223> Xaa是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (7) ... (7)

<223> Xaa是Gly或Glu

<220>

<221> 变体

<222> (8) ... (8)

<223> Xaa是Gly、Lys或Arg

<400> 12

Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽的顺序模块

<220>

<221> 变体

<222> (9) ... (9)

<223> Xaa是任何氨基酸

<220>

<221> 重复序列

<222> (9) ... (9)

<223> 重复了8或12次

<400> 13

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu

1 5 10 15

Lys

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽的顺序模块

<220>

<221> 重复序列

<222> (9) ... (12)

<223> 重复了2或3次

<400> 14

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro

1 5 10 15

Gln Phe Glu Lys

20

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双-Strep-标签

<400> 15

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双-Strep-标签

<400> 16

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25 30

<210> 17

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双-Strep-标签

<400> 17

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双-Strep-标签

<400> 18

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20

<210> 19

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双-Strep-标签

<400> 19

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HA标签

<400> 20

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 21

<211> 11

<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> VSV-G标签  
<400> 21  
Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys  
1 5 10  
<210> 22  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> HSV标签  
<400> 22  
Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp  
1 5 10  
<210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> T7表位  
<400> 23  
Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly  
1 5 10  
<210> 24  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> HSV表位  
<400> 24  
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
1 5 10  
<210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>

<223> Myc表位

<400> 25

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> V5标签

<400> 26

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 27

<211> 126

<212> PRT

<213> 阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*)

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Val144-Thr45-Ala46-Arg47和

Glu117、Gly120、Try121 (突变蛋白m1-9)

<400> 27

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val

100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 28

<211> 139



<212> PRT

<213> 阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*)

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Val144-Thr45-Ala46-Arg47和  
Glu117、Gly120、Try121(突变蛋白m1-9)

<400> 28

```

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

```

<210> 29

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fab片段m13B8.2的可变重链

<400> 29

```

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

```

Phe	Met	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val
65					70					75					80
Phe	Phe	Lys	Leu	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Lys	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100				105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
				115				120					125		
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
				130				135				140			
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
				195				200					205		
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Gly	Ser
				210				215				220			
Ala	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240
Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys			
				245					250						

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fab片段m13B8.2的可变轻链

&lt;400&gt; 30

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

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Thr Leu			
65	70	75	80
Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala His Tyr Gly Asn			
	85	90	95
Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Ile			
	100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys			
	115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg			
	130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn			
145	150	155	160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
	165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
	180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
	195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser			
	210	215	

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗CD3抗体OKT3的可变重链

&lt;400&gt; 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr			
	20	25	30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3抗体OKT3的可变轻链

<400> 32

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn  
100 105

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28抗体CD28.3的可变重链

<400> 33

Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg  
1 5 10 15

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His  
20 25 30

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

Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys

50	55	60
Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu		
65	70	75
Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg		
	85	90
Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105
Met Val Thr Val		110
	115	

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗CD28抗体CD28.3的可变轻链

&lt;400&gt; 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly		
1	5	10
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
	20	25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile		
	35	40
Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser		
65	70	75
Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys		
	85	90
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
	100	105

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CD3ζ

&lt;400&gt; 35

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

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

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CD3ζ

&lt;400&gt; 36

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Glu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly
1				5				10				15			
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
20				25				30							
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
35				40				45							
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
50				55				60							
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg
65				70				75				80			
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
85				90				95							
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
100				105				110							

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CD3ζ

&lt;400&gt; 37

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                     20                      25                      30  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
                     35                      40                      45  
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
                     50                      55                      60  
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 65                      70                      75                      80  
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
                     85                      90                      95  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                     100                      105                      110

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 间隔子(IgG4铰链)

&lt;400&gt; 38

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
 1                      5                      10

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 间隔子(IgG4铰链)

&lt;400&gt; 39

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct

36

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 铰链-CH3间隔子

&lt;400&gt; 40

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

<210> 41

<211> 229

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 铰链-CH2-CH3间隔子

<400> 41

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



Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

<210> 42

<211> 282

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> IgD-铰链-Fc

<400> 42

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

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys  
 165 170 175  
 Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser  
 180 185 190  
 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu  
 195 200 205  
 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro  
 210 215 220  
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser  
 225 230 235 240  
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr  
 245 250 255  
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg  
 260 265 270  
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His  
 275 280

<210> 43

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 43

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp  
 1 5 10 15  
 Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg  
 20

<210> 44

<211> 357

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 44

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20	25	30
Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe		
35	40	45
Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala		
50	55	60
Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu		
65	70	75
80		
Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile		
85	90	95
Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu		
100	105	110
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala		
115	120	125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu		
130	135	140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr		
145	150	155
160		
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys		
165	170	175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly		
180	185	190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu		
195	200	205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys		
210	215	220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu		
225	230	235
240		
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met		
245	250	255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala		
260	265	270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val		
275	280	285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His		
290	295	300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro		
305	310	315
320		
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala		
325	330	335

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly  
 340 345 350

Ile Gly Leu Phe Met  
 355

<210> 45

<211> 1071

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 45

```
atgcttctcc tggtgacaag cttctctctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg 60
atccccacgca aagtgtgtaa cggaataggt attggtgaat tttaagactc actctccata 120
aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc 180
ctgccggtgg catttagggg tgactccttc acacatactc ctctcttgga tccacaggaa 240
ctggatatctc tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct 300
gaaaacagga cggacctcca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgcgg caggaccaag 360
caacatgggc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420
tcctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 480
gcaaatacaa taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata 540
agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc 600
cccgagggct gctggggccc ggagcccagg gactgcgtct cttgccgga tgctagccga 660
ggcaggggat gcgtggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgtggag 720
aactctgagt gcatacagt ccacctcagg tgcctgcctc aggccatgaa catcacctgc 780
acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgccact acattgacgg cccccactgc 840
gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca ccctggtctg gaagtacga 900
gacgccggcc atgtgtgcca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca 960
ggtcttgaag gctgtccaac gaatgggcct aagatcccg ccatcgccac tgggatggtg 1020
ggggccctcc tcttgctgct ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat g 1071
```

<210> 46

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 46

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20	25	30
Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe		
35	40	45
Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr		
50	55	60
Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn		
65	70	75
Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg		
85	90	95
Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile		
100	105	110
Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val		
115	120	125
Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp		
130	135	140
Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn		
145	150	155
Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu		
165	170	175
Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser		
180	185	190
Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu		
195	200	205
Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln		
210	215	220
Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly		
225	230	235
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro		
245	250	255
His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr		
260	265	270
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His		
275	280	285
Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro		
290	295	300
Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala		
305	310	315
Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met		
325	330	335

<210> 47  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <223> GMCSFR $\alpha$ 链信号序列  
 <400> 47  
 atgcttctcc tggtagacaag ctttctgctc tgtgagttac cacaccacagc attcctcctg 60  
 atccca 66  
 <210> 48  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <223> GMCSFR $\alpha$ 链信号序列  
 <400> 48  
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro  
 20  
 <210> 49  
 <211> 1186  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <223> HER1/ErbB1/EGFR全长(成熟)  
 <300>  
 <308> UniProt编号P00533  
 <309> 1986-07-21  
 <400> 49  
 Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn  
 20 25 30  
 Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg  
 35 40 45  
 Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr  
 50 55 60  
 Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu

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

Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu			
385	390	395	400
Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val			
	405	410	415
Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile			
	420	425	430
Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala			
	435	440	445
Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr			
	450	455	460
Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln			
465	470	475	480
Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro			
	485	490	495
Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val			
	500	505	510
Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn			
	515	520	525
Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn			
	530	535	540
Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His			
545	550	555	560
Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met			
	565	570	575
Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val			
	580	585	590
Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly			
	595	600	605
Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr			
	610	615	620
Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile			
625	630	635	640
Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg			
	645	650	655
Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly			
	660	665	670
Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe			
	675	680	685
Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys			



690	695	700
Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile		
705	710	715
Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu		
725	730	735
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg		
740	745	750
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu		
755	760	765
Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn		
770	775	780
Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly		
785	790	795
Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala		
805	810	815
Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe		
820	825	830
Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu		
835	840	845
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His		
850	855	860
Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val		
865	870	875
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala		
885	890	895
Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro		
900	905	910
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met		
915	920	925
Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe		
930	935	940
Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp		
945	950	955
Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala		
965	970	975
Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr		
980	985	990
Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr		
995	1000	1005

Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala  
 1010 1015 1020  
 Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp  
 1045 1050 1055  
 Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser  
 1060 1065 1070  
 Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn  
 1075 1080 1085  
 Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro  
 1090 1095 1100  
 His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro  
 1105 1110 1115 1120  
 Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys  
 1125 1130 1135  
 Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe  
 1140 1145 1150  
 Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala  
 1155 1160 1165  
 Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile  
 1170 1175 1180  
 Gly Ala  
 1185  
 <210> 50  
 <211> 1233  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <223> HER2/neu/ErbB2全长(成熟)  
 <300>  
 <308> UniProt编号P04626  
 <309> 1987-08-13  
 <400> 50  
 Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln  
 20 25 30  
 Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser

35	40	45
Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile		
50	55	60
Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val		
65	70	75
Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp		
85	90	95
Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro		
100	105	110
Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys		
115	120	125
Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr		
130	135	140
Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr		
145	150	155
Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met		
165	170	175
Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser		
180	185	190
Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro		
195	200	205
Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly		
210	215	220
Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly		
225	230	235
Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr		
245	250	255
Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser		
260	265	270
Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser		
275	280	285
Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp		
290	295	300
Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys		
305	310	315
Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser		
325	330	335
Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu		
340	345	350

Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala		
355	360	365
Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile		
370	375	380
Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu		
385	390	395 400
Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn		
405	410	415
Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly		
420	425	430
Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His		
435	440	445
Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe		
450	455	460
Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp		
465	470	475 480
Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly		
485	490	495
His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe		
500	505	510
Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu		
515	520	525
Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu		
530	535	540
Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp		
545	550	555 560
Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala		
565	570	575
Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp		
580	585	590
Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys		
595	600	605
Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln		
610	615	620
Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu		
625	630	635 640
Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg		
645	650	655
Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr		

660	665	670
Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala		
675	680	685
Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu		
690	695	700
Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp		
705	710	715
Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn		
725	730	735
Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met		
740	745	750
Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu		
755	760	765
Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu		
770	775	780
Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu		
785	790	795
Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp		
805	810	815
Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys		
820	825	830
Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu		
835	840	845
Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile		
850	855	860
Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln		
865	870	875
Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe		
885	890	895
Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu		
900	905	910
Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp		
915	920	925
Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg		
930	935	940
Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp		
945	950	955
Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser		
965	970	975

Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met		
980	985	990
Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe		
995	1000	1005
Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg		
1010	1015	1020
His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly		
1025	1030	1035
Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser		
1045	1050	1055
Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala		
1060	1065	1070
Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln		
1075	1080	1085
Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly		
1090	1095	1100
Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln		
1105	1110	1115
Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro		
1125	1130	1135
Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu Ser		
1140	1145	1150
Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala		
1155	1160	1165
Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro Gln		
1170	1175	1180
Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr		
1185	1190	1195
Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys		
1205	1210	1215
Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro		
1220	1225	1230

Val

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 1323

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HER3/ErbB3全长(成熟)

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; UniProt编号P21860

&lt;309&gt; 1991-05-01

&lt;400&gt; 51

```

Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr Leu Asn Gly
1           5           10           15
Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr Leu Tyr Lys
          20           25           30
Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu
          35           40           45
Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile Arg Glu Val
          50           55           60
Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr Leu Pro Leu
65           70           75           80
Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp Gly Lys Phe
          85           90           95
Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser His Ala Leu
          100          105          110
Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser Gly Gly Val
          115          120          125
Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr Ile Asp Trp
          130          135          140
Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val Lys Asp Asn
145          150          155          160
Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly Arg Cys Trp
          165          170          175
Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr Ile Cys Ala
          180          185          190
Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn Gln Cys Cys
          195          200          205
His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp Thr Asp Cys
          210          215          220
Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val Pro Arg Cys
225          230          235          240
Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu Glu Pro Asn
          245          250          255
Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala Ser Cys Pro
          260          265          270
His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala Cys Pro Pro

```

275	280	285
Asp Lys Met Glu Val	Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met	Cys Glu Pro Cys
290	295	300
Gly Gly Leu Cys Pro Lys	Ala Cys Glu Gly Thr Gly	Ser Gly Ser Arg
305	310	315
Phe Gln Thr Val Asp	Ser Ser Asn Ile Asp Gly	Phe Val Asn Cys Thr
325	330	335
Lys Ile Leu Gly Asn Leu	Asp Phe Leu Ile Thr Gly	Leu Asn Gly Asp
340	345	350
Pro Trp His Lys Ile Pro	Ala Leu Asp Pro Glu Lys	Leu Asn Val Phe
355	360	365
Arg Thr Val Arg Glu Ile	Thr Gly Tyr Leu Asn Ile	Gln Ser Trp Pro
370	375	380
Pro His Met His Asn Phe	Ser Val Phe Ser Asn Leu	Thr Thr Ile Gly
385	390	395
Gly Arg Ser Leu Tyr Asn	Arg Gly Phe Ser Leu Leu	Ile Met Lys Asn
405	410	415
Leu Asn Val Thr Ser Leu	Gly Phe Arg Ser Leu Lys	Glu Ile Ser Ala
420	425	430
Gly Arg Ile Tyr Ile Ser	Ala Asn Arg Gln Leu Cys	Tyr His His Ser
435	440	445
Leu Asn Trp Thr Lys Val	Leu Arg Gly Pro Thr Glu	Glu Arg Leu Asp
450	455	460
Ile Lys His Asn Arg Pro	Arg Arg Asp Cys Val Ala	Glu Gly Lys Val
465	470	475
Cys Asp Pro Leu Cys Ser	Ser Gly Gly Cys Trp Gly	Pro Gly Pro Gly
485	490	495
Gln Cys Leu Ser Cys Arg	Asn Tyr Ser Arg Gly Gly	Val Cys Val Thr
500	505	510
His Cys Asn Phe Leu Asn	Gly Glu Pro Arg Glu Phe	Ala His Glu Ala
515	520	525
Glu Cys Phe Ser Cys His	Pro Glu Cys Gln Pro Met	Glu Gly Thr Ala
530	535	540
Thr Cys Asn Gly Ser Gly	Ser Asp Thr Cys Ala Gln	Cys Ala His Phe
545	550	555
Arg Asp Gly Pro His Cys	Val Ser Ser Cys Pro His	Gly Val Leu Gly
565	570	575
Ala Lys Gly Pro Ile Tyr	Lys Tyr Pro Asp Val Gln	Asn Glu Cys Arg
580	585	590



Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro Glu Leu Gln		
595	600	605
Asp Cys Leu Gly Gln Thr Leu Val Leu Ile Gly Lys Thr His Leu Thr		
610	615	620
Met Ala Leu Thr Val Ile Ala Gly Leu Val Val Ile Phe Met Met Leu		
625	630	635
Gly Gly Thr Phe Leu Tyr Trp Arg Gly Arg Arg Ile Gln Asn Lys Arg		
645	650	655
Ala Met Arg Arg Tyr Leu Glu Arg Gly Glu Ser Ile Glu Pro Leu Asp		
660	665	670
Pro Ser Glu Lys Ala Asn Lys Val Leu Ala Arg Ile Phe Lys Glu Thr		
675	680	685
Glu Leu Arg Lys Leu Lys Val Leu Gly Ser Gly Val Phe Gly Thr Val		
690	695	700
His Lys Gly Val Trp Ile Pro Glu Gly Glu Ser Ile Lys Ile Pro Val		
705	710	715
Cys Ile Lys Val Ile Glu Asp Lys Ser Gly Arg Gln Ser Phe Gln Ala		
725	730	735
Val Thr Asp His Met Leu Ala Ile Gly Ser Leu Asp His Ala His Ile		
740	745	750
Val Arg Leu Leu Gly Leu Cys Pro Gly Ser Ser Leu Gln Leu Val Thr		
755	760	765
Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp His Val Arg Gln His Arg		
770	775	780
Gly Ala Leu Gly Pro Gln Leu Leu Leu Asn Trp Gly Val Gln Ile Ala		
785	790	795
Lys Gly Met Tyr Tyr Leu Glu Glu His Gly Met Val His Arg Asn Leu		
805	810	815
Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Lys Ser Pro Ser Gln Val Gln Val Ala		
820	825	830
Asp Phe Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Pro Asp Asp Lys Gln Leu Leu		
835	840	845
Tyr Ser Glu Ala Lys Thr Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile		
850	855	860
His Phe Gly Lys Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val		
865	870	875
Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Glu Pro Tyr Ala Gly Leu		
885	890	895
Arg Leu Ala Glu Val Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Ala		

900	905	910
Gln Pro Gln Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Met Val Lys Cys		
915	920	925
Trp Met Ile Asp Glu Asn Ile Arg Pro Thr Phe Lys Glu Leu Ala Asn		
930	935	940
Glu Phe Thr Arg Met Ala Arg Asp Pro Pro Arg Tyr Leu Val Ile Lys		
945	950	955
Arg Glu Ser Gly Pro Gly Ile Ala Pro Gly Pro Glu Pro His Gly Leu		
965	970	975
Thr Asn Lys Lys Leu Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Glu Leu Asp Leu		
980	985	990
Asp Leu Asp Leu Glu Ala Glu Glu Asp Asn Leu Ala Thr Thr Thr Leu		
995	1000	1005
Gly Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Gly Thr Leu Asn Arg Pro Arg Gly		
1010	1015	1020
Ser Gln Ser Leu Leu Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Met Pro Met Asn Gln		
1025	1030	1035
Gly Asn Leu Gly Glu Ser Cys Gln Glu Ser Ala Val Ser Gly Ser Ser		
1045	1050	1055
Glu Arg Cys Pro Arg Pro Val Ser Leu His Pro Met Pro Arg Gly Cys		
1060	1065	1070
Leu Ala Ser Glu Ser Ser Glu Gly His Val Thr Gly Ser Glu Ala Glu		
1075	1080	1085
Leu Gln Glu Lys Val Ser Met Cys Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser		
1090	1095	1100
Pro Arg Pro Arg Gly Asp Ser Ala Tyr His Ser Gln Arg His Ser Leu		
1105	1110	1115
Leu Thr Pro Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu Asp		
1125	1130	1135
Val Asn Gly Tyr Val Met Pro Asp Thr His Leu Lys Gly Thr Pro Ser		
1140	1145	1150
Ser Arg Glu Gly Thr Leu Ser Ser Val Gly Leu Ser Ser Val Leu Gly		
1155	1160	1165
Thr Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Tyr Met Asn Arg Arg		
1170	1175	1180
Arg Arg His Ser Pro Pro His Pro Pro Arg Pro Ser Ser Leu Glu Glu		
1185	1190	1195
Leu Gly Tyr Glu Tyr Met Asp Val Gly Ser Asp Leu Ser Ala Ser Leu		
1205	1210	1215

Gly Ser Thr Gln Ser Cys Pro Leu His Pro Val Pro Ile Met Pro Thr  
 1220 1225 1230  
 Ala Gly Thr Thr Pro Asp Glu Asp Tyr Glu Tyr Met Asn Arg Gln Arg  
 1235 1240 1245  
 Asp Gly Gly Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Ala Met Gly Ala Cys Pro  
 1250 1255 1260  
 Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg Ala Phe Gln Gly Pro Gly  
 1265 1270 1275 1280  
 His Gln Ala Pro His Val His Tyr Ala Arg Leu Lys Thr Leu Arg Ser  
 1285 1290 1295  
 Leu Glu Ala Thr Asp Ser Ala Phe Asp Asn Pro Asp Tyr Trp His Ser  
 1300 1305 1310  
 Arg Leu Phe Pro Lys Ala Asn Ala Gln Arg Thr  
 1315 1320

<210> 52

<211> 1283

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> HER4/ErbB4全长(成熟)

<300>

<308> UniProt编号Q15303

<309> 1998-12-15

<400> 52

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

115	120	125
Phe Leu Cys Tyr Ala Asp Thr	Ile His Trp Gln Asp	Ile Val Arg Asn
130	135	140
Pro Trp Pro Ser Asn Leu Thr	Leu Val Ser Thr Asn Gly	Ser Ser Gly
145	150	155
Cys Gly Arg Cys His Lys Ser	Cys Thr Gly Arg Cys Trp	Gly Pro Thr
165	170	175
Glu Asn His Cys Gln Thr Leu Thr	Arg Thr Val Cys Ala Glu	Gln Cys
180	185	190
Asp Gly Arg Cys Tyr Gly Pro Tyr	Val Ser Asp Cys Cys His Arg	Glu
195	200	205
Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro	Lys Asp Thr Asp Cys Phe Ala	Cys
210	215	220
Met Asn Phe Asn Asp Ser Gly Ala	Cys Val Thr Gln Cys Pro Gln	Thr
225	230	235
Phe Val Tyr Asn Pro Thr Thr Phe	Gln Leu Glu His Asn Phe Asn	Ala
245	250	255
Lys Tyr Thr Tyr Gly Ala Phe Cys	Val Lys Lys Cys Pro His Asn	Phe
260	265	270
Val Val Asp Ser Ser Ser Cys Val	Arg Ala Cys Pro Ser Ser Lys	Met
275	280	285
Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Lys	Met Cys Lys Pro Cys Thr Asp	Ile
290	295	300
Cys Pro Lys Ala Cys Asp Gly Ile	Gly Thr Gly Ser Leu Met Ser	Ala
305	310	315
Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile	Asp Lys Phe Ile Asn Cys Thr	Lys
325	330	335
Ile Asn Gly Asn Leu Ile Phe Leu	Val Thr Gly Ile His Gly Asp	Pro
340	345	350
Tyr Asn Ala Ile Glu Ala Ile Asp	Pro Glu Lys Leu Asn Val Phe	Arg
355	360	365
Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Phe	Leu Asn Ile Gln Ser Trp Pro	Pro
370	375	380
Asn Met Thr Asp Phe Ser Val Phe	Ser Asn Leu Val Thr Ile Gly	Gly
385	390	395
Arg Val Leu Tyr Ser Gly Leu Ser	Leu Leu Ile Leu Lys Gln Gln	Gly
405	410	415
Ile Thr Ser Leu Gln Phe Gln Ser	Leu Lys Glu Ile Ser Ala Gly	Asn
420	425	430

Ile Tyr Ile Thr Asp Asn Ser Asn Leu Cys Tyr Tyr His Thr Ile Asn		
435	440	445
Trp Thr Thr Leu Phe Ser Thr Ile Asn Gln Arg Ile Val Ile Arg Asp		
450	455	460
Asn Arg Lys Ala Glu Asn Cys Thr Ala Glu Gly Met Val Cys Asn His		
465	470	475 480
Leu Cys Ser Ser Asp Gly Cys Trp Gly Pro Gly Pro Asp Gln Cys Leu		
	485	490 495
Ser Cys Arg Arg Phe Ser Arg Gly Arg Ile Cys Ile Glu Ser Cys Asn		
	500	505 510
Leu Tyr Asp Gly Glu Phe Arg Glu Phe Glu Asn Gly Ser Ile Cys Val		
	515	520 525
Glu Cys Asp Pro Gln Cys Glu Lys Met Glu Asp Gly Leu Leu Thr Cys		
	530	535 540
His Gly Pro Gly Pro Asp Asn Cys Thr Lys Cys Ser His Phe Lys Asp		
545	550	555 560
Gly Pro Asn Cys Val Glu Lys Cys Pro Asp Gly Leu Gln Gly Ala Asn		
	565	570 575
Ser Phe Ile Phe Lys Tyr Ala Asp Pro Asp Arg Glu Cys His Pro Cys		
	580	585 590
His Pro Asn Cys Thr Gln Gly Cys Asn Gly Pro Thr Ser His Asp Cys		
	595	600 605
Ile Tyr Tyr Pro Trp Thr Gly His Ser Thr Leu Pro Gln His Ala Arg		
610	615	620
Thr Pro Leu Ile Ala Ala Gly Val Ile Gly Gly Leu Phe Ile Leu Val		
625	630	635 640
Ile Val Gly Leu Thr Phe Ala Val Tyr Val Arg Arg Lys Ser Ile Lys		
	645	650 655
Lys Lys Arg Ala Leu Arg Arg Phe Leu Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro		
	660	665 670
Leu Thr Pro Ser Gly Thr Ala Pro Asn Gln Ala Gln Leu Arg Ile Leu		
	675	680 685
Lys Glu Thr Glu Leu Lys Arg Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe		
	690	695 700
Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Val Pro Glu Gly Glu Thr Val Lys		
705	710	715 720
Ile Pro Val Ala Ile Lys Ile Leu Asn Glu Thr Thr Gly Pro Lys Ala		
	725	730 735
Asn Val Glu Phe Met Asp Glu Ala Leu Ile Met Ala Ser Met Asp His		

740	745	750
Pro His Leu Val Arg Leu Leu Gly Val Cys Leu Ser Pro Thr Ile Gln		
755	760	765
Leu Val Thr Gln Leu Met Pro His Gly Cys Leu Leu Glu Tyr Val His		
770	775	780
Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Leu Leu Leu Asn Trp Cys Val		
785	790	795
Gln Ile Ala Lys Gly Met Met Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Leu Val His		
805	810	815
Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val		
820	825	830
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Glu Gly Asp Glu Lys		
835	840	845
Glu Tyr Asn Ala Asp Gly Gly Lys Met Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu		
850	855	860
Glu Cys Ile His Tyr Arg Lys Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser		
865	870	875
Tyr Gly Val Thr Ile Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Gly Lys Pro Tyr		
885	890	895
Asp Gly Ile Pro Thr Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu		
900	905	910
Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Met		
915	920	925
Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Lys Glu		
930	935	940
Leu Ala Ala Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu		
945	950	955
Val Ile Gln Gly Asp Asp Arg Met Lys Leu Pro Ser Pro Asn Asp Ser		
965	970	975
Lys Phe Phe Gln Asn Leu Leu Asp Glu Glu Asp Leu Glu Asp Met Met		
980	985	990
Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Ala Phe Asn Ile Pro Pro Pro		
995	1000	1005
Ile Tyr Thr Ser Arg Ala Arg Ile Asp Ser Asn Arg Ser Glu Ile Gly		
1010	1015	1020
His Ser Pro Pro Pro Ala Tyr Thr Pro Met Ser Gly Asn Gln Phe Val		
1025	1030	1035
Tyr Arg Asp Gly Gly Phe Ala Ala Glu Gln Gly Val Ser Val Pro Tyr		
1045	1050	1055

Arg Ala Pro Thr Ser Thr Ile Pro Glu Ala Pro Val Ala Gln Gly Ala		
1060	1065	1070
Thr Ala Glu Ile Phe Asp Asp Ser Cys Cys Asn Gly Thr Leu Arg Lys		
1075	1080	1085
Pro Val Ala Pro His Val Gln Glu Asp Ser Ser Thr Gln Arg Tyr Ser		
1090	1095	1100
Ala Asp Pro Thr Val Phe Ala Pro Glu Arg Ser Pro Arg Gly Glu Leu		
1105	1110	1115
Asp Glu Glu Gly Tyr Met Thr Pro Met Arg Asp Lys Pro Lys Gln Glu		
1125	1130	1135
Tyr Leu Asn Pro Val Glu Glu Asn Pro Phe Val Ser Arg Arg Lys Asn		
1140	1145	1150
Gly Asp Leu Gln Ala Leu Asp Asn Pro Glu Tyr His Asn Ala Ser Asn		
1155	1160	1165
Gly Pro Pro Lys Ala Glu Asp Glu Tyr Val Asn Glu Pro Leu Tyr Leu		
1170	1175	1180
Asn Thr Phe Ala Asn Thr Leu Gly Lys Ala Glu Tyr Leu Lys Asn Asn		
1185	1190	1195
Ile Leu Ser Met Pro Glu Lys Ala Lys Lys Ala Phe Asp Asn Pro Asp		
1205	1210	1215
Tyr Trp Asn His Ser Leu Pro Pro Arg Ser Thr Leu Gln His Pro Asp		
1220	1225	1230
Tyr Leu Gln Glu Tyr Ser Thr Lys Tyr Phe Tyr Lys Gln Asn Gly Arg		
1235	1240	1245
Ile Arg Pro Ile Val Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Ser Glu Phe Ser		
1250	1255	1260
Leu Lys Pro Gly Thr Val Leu Pro Pro Pro Pro Tyr Arg His Arg Asn		
1265	1270	1275
Thr Val Val		
<210> 53		
<211> 1366		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<220>		
<223> HGFR/c-Met全长(成熟)		
<300>		
<308> UniProt编号P08581		
<309> 1988-08-01		
<400> 53		

Glu	Cys	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys	Ser	Glu	Met	Asn	Val	Asn	Met	Lys
1				5					10					15	
Tyr	Gln	Leu	Pro	Asn	Phe	Thr	Ala	Glu	Thr	Pro	Ile	Gln	Asn	Val	Ile
			20					25					30		
Leu	His	Glu	His	His	Ile	Phe	Leu	Gly	Ala	Thr	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Val
		35					40					45			
Leu	Asn	Glu	Glu	Asp	Leu	Gln	Lys	Val	Ala	Glu	Tyr	Lys	Thr	Gly	Pro
		50				55					60				
Val	Leu	Glu	His	Pro	Asp	Cys	Phe	Pro	Cys	Gln	Asp	Cys	Ser	Ser	Lys
65					70					75					80
Ala	Asn	Leu	Ser	Gly	Gly	Val	Trp	Lys	Asp	Asn	Ile	Asn	Met	Ala	Leu
				85					90					95	
Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Val
			100					105					110		
Asn	Arg	Gly	Thr	Cys	Gln	Arg	His	Val	Phe	Pro	His	Asn	His	Thr	Ala
		115					120					125			
Asp	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	His	Cys	Ile	Phe	Ser	Pro	Gln	Ile	Glu	Glu
		130				135					140				
Pro	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Cys	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Val
145					150					155					160
Leu	Ser	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Ile	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Asn	Thr
				165					170					175	
Ile	Asn	Ser	Ser	Tyr	Phe	Pro	Asp	His	Pro	Leu	His	Ser	Ile	Ser	Val
			180					185					190		
Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Lys	Asp	Gly	Phe	Met	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln
		195					200					205			
Ser	Tyr	Ile	Asp	Val	Leu	Pro	Glu	Phe	Arg	Asp	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys
		210				215					220				
Tyr	Val	His	Ala	Phe	Glu	Ser	Asn	Asn	Phe	Ile	Tyr	Phe	Leu	Thr	Val
225					230				235						240
Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala	Gln	Thr	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg
				245					250					255	
Phe	Cys	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Leu	His	Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Pro	Leu
			260				265						270		
Glu	Cys	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Ser	Thr	Lys	Lys	Glu
		275					280					285			
Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Ala	Ala	Tyr	Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Gln
		290				295					300				
Leu	Ala	Arg	Gln	Ile	Gly	Ala	Ser	Leu	Asn	Asp	Asp	Ile	Leu	Phe	Gly



305	310	315	320
Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser			
	325	330	335
Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys			
	340	345	350
Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro			
	355	360	365
Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly			
	370	375	380
Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu			
385	390	395	400
Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr			
	405	410	415
Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly			
	420	425	430
Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro			
	435	440	445
Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro			
	450	455	460
Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val			
465	470	475	480
Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys			
	485	490	495
Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val			
	500	505	510
Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu			
	515	520	525
Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val			
	530	535	540
Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys			
545	550	555	560
Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys			
	565	570	575
Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu			
	580	585	590
Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys			
	595	600	605
His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln			
610	615	620	

Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro			
625	630	635	640
Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn			
	645	650	655
Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr			
	660	665	670
Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro			
	675	680	685
Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu			
	690	695	700
Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val			
705	710	715	720
Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile			
	725	730	735
Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val			
	740	745	750
Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His			
	755	760	765
Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln			
	770	775	780
Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp			
785	790	795	800
Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val			
	805	810	815
Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn			
	820	825	830
Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly			
	835	840	845
Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His			
	850	855	860
Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn			
865	870	875	880
Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu			
	885	890	895
Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala			
	900	905	910
Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe			
	915	920	925
Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu			

930	935	940
Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val		
945	950	955
Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser		
965	970	975
Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser		
980	985	990
Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser		
995	1000	1005
Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln		
1010	1015	1020
Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln		
1025	1030	1035
Ala Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe		
1045	1050	1055
Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr		
1060	1065	1070
Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu		
1075	1080	1085
Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly		
1090	1095	1100
Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly		
1105	1110	1115
Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val Val Leu Pro Tyr Met		
1125	1130	1135
Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu Thr His Asn Pro		
1140	1145	1150
Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln Val Ala Lys Gly Met		
1155	1160	1165
Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg		
1170	1175	1180
Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly		
1185	1190	1195
Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys		
1205	1210	1215
Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln		
1220	1225	1230
Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu		
1235	1240	1245

Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn  
 1250 1255 1260  
 Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln  
 1265 1270 1275 1280  
 Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp  
 1285 1290 1295  
 His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg  
 1300 1305 1310  
 Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val  
 1315 1320 1325  
 Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu  
 1330 1335 1340  
 Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala  
 1345 1350 1355 1360  
 Ser Phe Trp Glu Thr Ser  
 1365

<210> 54

<211> 1367

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> IGF-1 R全长(成熟)

<300>

<308> UniProt编号P08069

<309> 1988-08-01

<400> 54

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile  
 20 25 30  
 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg  
 35 40 45  
 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile  
 50 55 60  
 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu  
 85 90 95  
 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe

	100		105		110
Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile					
115		120		125	
Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu					
130		135		140	
Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile					
145		150		155	160
Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys					
	165		170		175
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys					
180		185		190	
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr					
195		200		205	
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys					
210		215		220	
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser					
225		230		235	240
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr					
	245		250		255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu					
260		265		270	
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala					
275		280		285	
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met					
290		295		300	
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr					
305		310		315	320
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys					
	325		330		335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly					
340		345		350	
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn					
355		360		365	
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val					
370		375		380	
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser					
385		390		395	400
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly					
	405		410		415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp		
420	425	430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe		
435	440	445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu		
450	455	460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg		
465	470	475
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr		
485	490	495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr		
500	505	510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys		
515	520	525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys		
530	535	540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys		
545	550	555
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln		
565	570	575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp		
580	585	590
His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala		
595	600	605
Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser		
610	615	620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn		
625	630	635
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr		
645	650	655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys		
660	665	670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys		
675	680	685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys		
690	695	700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys		
705	710	715
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu		

				725					730					735			
Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser	Ser		
				740					745					750			
Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp	Pro		
				755					760					765			
Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Asn		
				770					775					780			
Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg		
785					790					795					800		
Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Ser		
				805					810					815			
Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp		
				820					825					830			
Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser	Ile		
				835					840					845			
Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Leu	Met		
				850					855					860			
Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys	Val		
865					870					875					880		
Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu		
				885					890					895			
Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly		
				900					905					910			
Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Lys	Thr		
				915					920					925			
Gly	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ile	His	Leu	Ile	Ile	Ala	Leu	Pro	Val	Ala	Val		
				930					935					940			
Leu	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Met	Leu	Tyr	Val	Phe	His	Arg		
945					950					955					960		
Lys	Arg	Asn	Asn	Ser	Arg	Leu	Gly	Asn	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Ser	Val		
				965					970					975			
Asn	Pro	Glu	Tyr	Phe	Ser	Ala	Ala	Asp	Val	Tyr	Val	Pro	Asp	Glu	Trp		
				980					985					990			
Glu	Val	Ala	Arg	Glu	Lys	Ile	Thr	Met	Ser	Arg	Glu	Leu	Gly	Gln	Gly		
				995					1000					1005			
Ser	Phe	Gly	Met	Val	Tyr	Glu	Gly	Val	Ala	Lys	Gly	Val	Val	Lys	Asp		
				1010					1015					1020			
Glu	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Val	Asn	Glu	Ala	Ala	Ser		
1025					1030					1035					1040		

Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Glu			
1045	1050	1055	
Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Gln Gly			
1060	1065	1070	
Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr Arg Gly Asp Leu Lys			
1075	1080	1085	
Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met Glu Asn Asn Pro Val Leu			
1090	1095	1100	
Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala			
1105	1110	1115	1120
Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu			
1125	1130	1135	
Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly			
1140	1145	1150	
Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys			
1155	1160	1165	
Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu			
1170	1175	1180	
Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val			
1185	1190	1195	1200
Val Leu Trp Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu			
1205	1210	1215	
Ser Asn Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp			
1220	1225	1230	
Lys Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys			
1235	1240	1245	
Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile Ser			
1250	1255	1260	
Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser Phe Tyr			
1265	1270	1275	1280
Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu Asp Leu Glu			
1285	1290	1295	
Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser Ala Ser Ser Ser			
1300	1305	1310	
Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His Lys Ala Glu Asn Gly			
1315	1320	1325	
Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala Ser Phe Asp Glu Arg Gln			
1330	1335	1340	
Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro			



1345	1350	1355	1360
Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys			
	1365		
<210> 55			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 55			
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr			
1	5	10	15
Lys Gly			
<210> 56			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 接头			
<400> 56			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
1	5	10	
<210> 57			
<211> 1005			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> tEGFR			
<400> 57			
cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 60			
acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg 120			
gtggcatтта ggggtgactc cttcacacat actcctctc tggatccaca ggaactggat 180			
attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac 240			
aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat 300			
ggtcagtttt ctcttgcaat cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc 360			
aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat 420			
acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaact tataagcaac 480			
agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag 540			
ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg 600			

gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct 660  
gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga 720  
cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggccccca ctgcgtcaag 780  
acctgccccg caggagtcat gggagaaaac aacaccctgg tctggaagta cgcagacgcc 840  
ggccatgtgt gccacctgtg ccattccaaac tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt 900  
gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg ccactgggat ggtggggggc 960  
ctcctcttgc tgctggtggt ggccctgggg atcggcctct tcatg 1005

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽,Strep-标签 II

<400> 58

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 59

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 60

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 61

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 61

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 62

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MAT标签

<400> 63

His Asn His Arg His Lys His Gly Gly Gly Cys

1

5

10

<210> 64

<211> 1210

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> HER1/ErbB1/EGFR全长(前体)

<300>

<308> UniProt编号P00533

<309> 1986-07-21

<400> 64

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1

5

10

15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20

25

30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35

40

45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50	55	60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val	Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys	
65	70	75
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val		80
	85	90
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr		95
100	105	110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn		
115	120	125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu		
130	135	140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu		
145	150	155
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met		
165	170	175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro		
180	185	190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln		
195	200	205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg		
210	215	220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys		
225	230	235
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp		
245	250	255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro		
260	265	270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly		
275	280	285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His		
290	295	300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu		
305	310	315
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val		
325	330	335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
340	345	350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		
355	360	365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr			
370	375	380	
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu			
385	390	395	400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp			
	405	410	415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln			
	420	425	430
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu			
	435	440	445
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser			
	450	455	460
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu			
465	470	475	480
Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu			
	485	490	495
Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro			
	500	505	510
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn			
	515	520	525
Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly			
	530	535	540
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro			
545	550	555	560
Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro			
	565	570	575
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val			
	580	585	590
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp			
	595	600	605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys			
	610	615	620
Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly			
625	630	635	640
Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu			
	645	650	655
Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His			
	660	665	670
Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu			

675	680	685
Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu		
690	695	700
Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser		
705	710	715
Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu		
725	730	735
Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser		
740	745	750
Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser		
755	760	765
Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser		
770	775	780
Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp		
785	790	795
Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn		
805	810	815
Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg		
820	825	830
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro		
835	840	845
Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala		
850	855	860
Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp		
865	870	875
Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp		
885	890	895
Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser		
900	905	910
Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu		
915	920	925
Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr		
930	935	940
Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys		
945	950	955
Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln		
965	970	975
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro		
980	985	990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp		
995	1000	1005
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe		
1010	1015	1020
Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala		
1025	1030	1035 1040
Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln		
1045	1050	1055
Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp		
1060	1065	1070
Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro		
1075	1080	1085
Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser		
1090	1095	1100
Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser		
1105	1110	1115 1120
Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro		
1125	1130	1135
Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp		
1140	1145	1150
Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp		
1155	1160	1165
Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn		
1170	1175	1180
Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val		
1185	1190	1195 1200
Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala		
1205	1210	

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 1255

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人 (Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HER2/neu/ErbB2全长(前体)

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; UniProt编号P04626

&lt;309&gt; 1987-08-13

&lt;400&gt; 65

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

1						5						10						15
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys			
			20						25						30			
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His			
			35						40						45			
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr			
			50						55						60			
Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val			
65						70						75			80			
Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu			
			85						90						95			
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr			
			100						105						110			
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro			
			115						120						125			
Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser			
130						135						140						
Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln			
145						150						155			160			
Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn			
			165						170						175			
Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys			
			180						185						190			
His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser			
			195						200						205			
Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys			
210						215						220						
Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys			
225						230						235			240			
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu			
			245						250						255			
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val			
			260						265						270			
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg			
			275						280						285			
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu			
290						295						300						
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln			
305						310						315			320			



Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys		
325	330	335
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu		
340	345	350
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys		
355	360	365
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp		
370	375	380
Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe		
385	390	395
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro		
405	410	415
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg		
420	425	430
Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu		
435	440	445
Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly		
450	455	460
Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val		
465	470	475
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr		
485	490	495
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His		
500	505	510
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys		
515	520	525
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys		
530	535	540
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys		
545	550	555
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys		
565	570	575
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp		
580	585	590
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu		
595	600	605
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln		
610	615	620
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys		

625	630	635	640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser			
	645	650	655
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly			
	660	665	670
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg			
	675	680	685
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly			
	690	695	700
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu			
705	710	715	720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys			
	725	730	735
Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile			
	740	745	750
Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu			
	755	760	765
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg			
	770	775	780
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu			
785	790	795	800
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg			
	805	810	815
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly			
	820	825	830
Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala			
	835	840	845
Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe			
	850	855	860
Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp			
865	870	875	880
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg			
	885	890	895
Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val			
	900	905	910
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala			
	915	920	925
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro			
	930	935	940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met			
945	950	955	960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe			
	965	970	975
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu			
	980	985	990
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu			
	995	1000	1005
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu			
	1010	1015	1020
Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly			
1025	1030	1035	1040
Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly			
	1045	1050	1055
Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg			
	1060	1065	1070
Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly			
	1075	1080	1085
Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His			
	1090	1095	1100
Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu			
1105	1110	1115	1120
Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln			
	1125	1130	1135
Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro			
	1140	1145	1150
Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu			
	1155	1160	1165
Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val			
	1170	1175	1180
Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln			
1185	1190	1195	1200
Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala			
	1205	1210	1215
Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala			
	1220	1225	1230
Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr			
	1235	1240	1245
Leu Gly Leu Asp Val Pro Val			

1250	1255
<210> 66	
<211> 1342	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<220>	
<223> HER3/ErbB3全长(前体)	
<300>	
<308> UniProt编号P21860	
<309> 1991-05-01	
<400> 66	
Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu	
1 5 10 15	
Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr	
20 25 30	
Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr	
35 40 45	
Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu	
50 55 60	
Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile	
65 70 75 80	
Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr	
85 90 95	
Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp	
100 105 110	
Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser	
115 120 125	
His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser	
130 135 140	
Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr	
145 150 155 160	
Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val	
165 170 175	
Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly	
180 185 190	
Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr	
195 200 205	
Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn	
210 215 220	

Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp			
225	230	235	240
Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val			
	245	250	255
Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu			
	260	265	270
Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala			
	275	280	285
Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala			
	290	295	300
Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys			
305	310	315	320
Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser			
	325	330	335
Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val			
	340	345	350
Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu			
	355	360	365
Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu			
	370	375	380
Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln			
385	390	395	400
Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr			
	405	410	415
Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile			
	420	425	430
Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu			
	435	440	445
Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr			
	450	455	460
His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu			
465	470	475	480
Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Val Ala Glu			
	485	490	495
Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro			
	500	505	510
Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg Gly Gly Val			
	515	520	525
Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Glu Pro Arg Glu Phe Ala			

530	535	540
His Glu Ala Glu Cys Phe Ser Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Met Glu		
545	550	555
Gly Thr Ala Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Asp Thr Cys Ala Gln Cys		
565	570	575
Ala His Phe Arg Asp Gly Pro His Cys Val Ser Ser Cys Pro His Gly		
580	585	590
Val Leu Gly Ala Lys Gly Pro Ile Tyr Lys Tyr Pro Asp Val Gln Asn		
595	600	605
Glu Cys Arg Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro		
610	615	620
Glu Leu Gln Asp Cys Leu Gly Gln Thr Leu Val Leu Ile Gly Lys Thr		
625	630	635
His Leu Thr Met Ala Leu Thr Val Ile Ala Gly Leu Val Val Ile Phe		
645	650	655
Met Met Leu Gly Gly Thr Phe Leu Tyr Trp Arg Gly Arg Arg Ile Gln		
660	665	670
Asn Lys Arg Ala Met Arg Arg Tyr Leu Glu Arg Gly Glu Ser Ile Glu		
675	680	685
Pro Leu Asp Pro Ser Glu Lys Ala Asn Lys Val Leu Ala Arg Ile Phe		
690	695	700
Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Leu Lys Val Leu Gly Ser Gly Val Phe		
705	710	715
Gly Thr Val His Lys Gly Val Trp Ile Pro Glu Gly Glu Ser Ile Lys		
725	730	735
Ile Pro Val Cys Ile Lys Val Ile Glu Asp Lys Ser Gly Arg Gln Ser		
740	745	750
Phe Gln Ala Val Thr Asp His Met Leu Ala Ile Gly Ser Leu Asp His		
755	760	765
Ala His Ile Val Arg Leu Leu Gly Leu Cys Pro Gly Ser Ser Leu Gln		
770	775	780
Leu Val Thr Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp His Val Arg		
785	790	795
Gln His Arg Gly Ala Leu Gly Pro Gln Leu Leu Leu Asn Trp Gly Val		
805	810	815
Gln Ile Ala Lys Gly Met Tyr Tyr Leu Glu Glu His Gly Met Val His		
820	825	830
Arg Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Lys Ser Pro Ser Gln Val		
835	840	845

Gln Val Ala Asp Phe Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Pro Asp Asp Lys		
850	855	860
Gln Leu Leu Tyr Ser Glu Ala Lys Thr Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu		
865	870	875 880
Glu Ser Ile His Phe Gly Lys Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser		
	885	890 895
Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Glu Pro Tyr		
	900	905 910
Ala Gly Leu Arg Leu Ala Glu Val Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu		
	915	920 925
Arg Leu Ala Gln Pro Gln Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Met		
	930	935 940
Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Glu Asn Ile Arg Pro Thr Phe Lys Glu		
945	950	955 960
Leu Ala Asn Glu Phe Thr Arg Met Ala Arg Asp Pro Pro Arg Tyr Leu		
	965	970 975
Val Ile Lys Arg Glu Ser Gly Pro Gly Ile Ala Pro Gly Pro Glu Pro		
	980	985 990
His Gly Leu Thr Asn Lys Lys Leu Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Glu		
	995	1000 1005
Leu Asp Leu Asp Leu Asp Leu Glu Ala Glu Glu Asp Asn Leu Ala Thr		
	1010	1015 1020
Thr Thr Leu Gly Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Gly Thr Leu Asn Arg		
1025	1030	1035 1040
Pro Arg Gly Ser Gln Ser Leu Leu Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Met Pro		
	1045	1050 1055
Met Asn Gln Gly Asn Leu Gly Glu Ser Cys Gln Glu Ser Ala Val Ser		
	1060	1065 1070
Gly Ser Ser Glu Arg Cys Pro Arg Pro Val Ser Leu His Pro Met Pro		
	1075	1080 1085
Arg Gly Cys Leu Ala Ser Glu Ser Ser Glu Gly His Val Thr Gly Ser		
	1090	1095 1100
Glu Ala Glu Leu Gln Glu Lys Val Ser Met Cys Arg Ser Arg Ser Arg		
1105	1110	1115 1120
Ser Arg Ser Pro Arg Pro Arg Gly Asp Ser Ala Tyr His Ser Gln Arg		
	1125	1130 1135
His Ser Leu Leu Thr Pro Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly Leu Glu		
	1140	1145 1150
Glu Glu Asp Val Asn Gly Tyr Val Met Pro Asp Thr His Leu Lys Gly		

1155	1160	1165
Thr Pro Ser Ser Arg Glu Gly Thr Leu Ser Ser Val Gly Leu Ser Ser		
1170	1175	1180
Val Leu Gly Thr Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Tyr Met		
1185	1190	1195
Asn Arg Arg Arg Arg His Ser Pro Pro His Pro Pro Arg Pro Ser Ser		1200
1205	1210	1215
Leu Glu Glu Leu Gly Tyr Glu Tyr Met Asp Val Gly Ser Asp Leu Ser		
1220	1225	1230
Ala Ser Leu Gly Ser Thr Gln Ser Cys Pro Leu His Pro Val Pro Ile		
1235	1240	1245
Met Pro Thr Ala Gly Thr Thr Pro Asp Glu Asp Tyr Glu Tyr Met Asn		
1250	1255	1260
Arg Gln Arg Asp Gly Gly Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Ala Met Gly		
1265	1270	1275
Ala Cys Pro Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg Ala Phe Gln		
1285	1290	1295
Gly Pro Gly His Gln Ala Pro His Val His Tyr Ala Arg Leu Lys Thr		
1300	1305	1310
Leu Arg Ser Leu Glu Ala Thr Asp Ser Ala Phe Asp Asn Pro Asp Tyr		
1315	1320	1325
Trp His Ser Arg Leu Phe Pro Lys Ala Asn Ala Gln Arg Thr		
1330	1335	1340
<210> 67		
<211> 1308		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<220>		
<223> HER4/ErbB4全长(前体)		
<300>		
<308> UniProt编号Q15303		
<309> 1998-12-15		
<400> 67		
Met Lys Pro Ala Thr Gly Leu Trp Val Trp Val Ser Leu Leu Val Ala		
1	5	10
Ala Gly Thr Val Gln Pro Ser Asp Ser Gln Ser Val Cys Ala Gly Thr		15
20	25	30
Glu Asn Lys Leu Ser Ser Leu Ser Asp Leu Glu Gln Gln Tyr Arg Ala		
35	40	45



Leu	Arg	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Cys	Glu	Val	Val	Met	Gly	Asn	Leu	Glu
50						55					60				
Ile	Thr	Ser	Ile	Glu	His	Asn	Arg	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Arg	Ser	Val
65					70				75					80	
Arg	Glu	Val	Thr	Gly	Tyr	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Asn	Gln	Phe	Arg	Tyr
				85					90					95	
Leu	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Ile	Ile	Arg	Gly	Thr	Lys	Leu	Tyr	Glu
			100						105					110	
Asp	Arg	Tyr	Ala	Leu	Ala	Ile	Phe	Leu	Asn	Tyr	Arg	Lys	Asp	Gly	Asn
		115					120						125		
Phe	Gly	Leu	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Lys	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Asn
		130				135						140			
Gly	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Gln	Asn	Lys	Phe	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asp	Thr
145					150					155					160
Ile	His	Trp	Gln	Asp	Ile	Val	Arg	Asn	Pro	Trp	Pro	Ser	Asn	Leu	Thr
				165					170					175	
Leu	Val	Ser	Thr	Asn	Gly	Ser	Ser	Gly	Cys	Gly	Arg	Cys	His	Lys	Ser
			180						185					190	
Cys	Thr	Gly	Arg	Cys	Trp	Gly	Pro	Thr	Glu	Asn	His	Cys	Gln	Thr	Leu
		195					200						205		
Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Glu	Gln	Cys	Asp	Gly	Arg	Cys	Tyr	Gly	Pro
		210					215						220		
Tyr	Val	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Arg	Glu	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly
225					230					235					240
Pro	Lys	Asp	Thr	Asp	Cys	Phe	Ala	Cys	Met	Asn	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly
				245						250				255	
Ala	Cys	Val	Thr	Gln	Cys	Pro	Gln	Thr	Phe	Val	Tyr	Asn	Pro	Thr	Thr
			260						265					270	
Phe	Gln	Leu	Glu	His	Asn	Phe	Asn	Ala	Lys	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Ala	Phe
		275					280						285		
Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	His	Asn	Phe	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Cys
		290					295						300		
Val	Arg	Ala	Cys	Pro	Ser	Ser	Lys	Met	Glu	Val	Glu	Glu	Asn	Gly	Ile
305					310					315					320
Lys	Met	Cys	Lys	Pro	Cys	Thr	Asp	Ile	Cys	Pro	Lys	Ala	Cys	Asp	Gly
				325						330				335	
Ile	Gly	Thr	Gly	Ser	Leu	Met	Ser	Ala	Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ser	Asn
			340						345					350	
Ile	Asp	Lys	Phe	Ile	Asn	Cys	Thr	Lys	Ile	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Phe

355	360	365
Leu Val Thr Gly Ile His Gly Asp Pro Tyr Asn Ala Ile Glu Ala Ile		
370	375	380
Asp Pro Glu Lys Leu Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly		
385	390	395
Phe Leu Asn Ile Gln Ser Trp Pro Pro Asn Met Thr Asp Phe Ser Val		
405	410	415
Phe Ser Asn Leu Val Thr Ile Gly Gly Arg Val Leu Tyr Ser Gly Leu		
420	425	430
Ser Leu Leu Ile Leu Lys Gln Gln Gly Ile Thr Ser Leu Gln Phe Gln		
435	440	445
Ser Leu Lys Glu Ile Ser Ala Gly Asn Ile Tyr Ile Thr Asp Asn Ser		
450	455	460
Asn Leu Cys Tyr Tyr His Thr Ile Asn Trp Thr Thr Leu Phe Ser Thr		
465	470	475
Ile Asn Gln Arg Ile Val Ile Arg Asp Asn Arg Lys Ala Glu Asn Cys		
485	490	495
Thr Ala Glu Gly Met Val Cys Asn His Leu Cys Ser Ser Asp Gly Cys		
500	505	510
Trp Gly Pro Gly Pro Asp Gln Cys Leu Ser Cys Arg Arg Phe Ser Arg		
515	520	525
Gly Arg Ile Cys Ile Glu Ser Cys Asn Leu Tyr Asp Gly Glu Phe Arg		
530	535	540
Glu Phe Glu Asn Gly Ser Ile Cys Val Glu Cys Asp Pro Gln Cys Glu		
545	550	555
Lys Met Glu Asp Gly Leu Leu Thr Cys His Gly Pro Gly Pro Asp Asn		
565	570	575
Cys Thr Lys Cys Ser His Phe Lys Asp Gly Pro Asn Cys Val Glu Lys		
580	585	590
Cys Pro Asp Gly Leu Gln Gly Ala Asn Ser Phe Ile Phe Lys Tyr Ala		
595	600	605
Asp Pro Asp Arg Glu Cys His Pro Cys His Pro Asn Cys Thr Gln Gly		
610	615	620
Cys Asn Gly Pro Thr Ser His Asp Cys Ile Tyr Tyr Pro Trp Thr Gly		
625	630	635
His Ser Thr Leu Pro Gln His Ala Arg Thr Pro Leu Ile Ala Ala Gly		
645	650	655
Val Ile Gly Gly Leu Phe Ile Leu Val Ile Val Gly Leu Thr Phe Ala		
660	665	670

Val Tyr Val Arg Arg Lys Ser Ile Lys Lys Lys Arg Ala Leu Arg Arg		
675	680	685
Phe Leu Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Thr Ala		
690	695	700
Pro Asn Gln Ala Gln Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Lys Arg		
705	710	715
Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile		
	725	730
		735
Trp Val Pro Glu Gly Glu Thr Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Ile		
	740	745
		750
Leu Asn Glu Thr Thr Gly Pro Lys Ala Asn Val Glu Phe Met Asp Glu		
	755	760
		765
Ala Leu Ile Met Ala Ser Met Asp His Pro His Leu Val Arg Leu Leu		
	770	775
		780
Gly Val Cys Leu Ser Pro Thr Ile Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro		
785	790	795
		800
His Gly Cys Leu Leu Glu Tyr Val His Glu His Lys Asp Asn Ile Gly		
	805	810
		815
Ser Gln Leu Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Met		
	820	825
		830
Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn		
	835	840
		845
Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu		
	850	855
		860
Ala Arg Leu Leu Glu Gly Asp Glu Lys Glu Tyr Asn Ala Asp Gly Gly		
865	870	875
		880
Lys Met Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Cys Ile His Tyr Arg Lys		
	885	890
		895
Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Ile Trp Glu		
	900	905
		910
Leu Met Thr Phe Gly Gly Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Thr Arg Glu		
	915	920
		925
Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile		
	930	935
		940
Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp		
945	950	955
		960
Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Lys Glu Leu Ala Ala Glu Phe Ser Arg		
	965	970
		975
Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Asp Arg		

			980				985				990					
Met	Lys	Leu	Pro	Ser	Pro	Asn	Asp	Ser	Lys	Phe	Phe	Gln	Asn	Leu	Leu	
			995				1000				1005					
Asp	Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Asp	Met	Met	Asp	Ala	Glu	Glu	Tyr	Leu	Val	
			1010				1015				1020					
Pro	Gln	Ala	Phe	Asn	Ile	Pro	Pro	Pro	Ile	Tyr	Thr	Ser	Arg	Ala	Arg	
1025							1030				1035				1040	
Ile	Asp	Ser	Asn	Arg	Ser	Glu	Ile	Gly	His	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Tyr	
			1045				1050				1055					
Thr	Pro	Met	Ser	Gly	Asn	Gln	Phe	Val	Tyr	Arg	Asp	Gly	Gly	Phe	Ala	
			1060				1065				1070					
Ala	Glu	Gln	Gly	Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Arg	Ala	Pro	Thr	Ser	Thr	Ile	
			1075				1080				1085					
Pro	Glu	Ala	Pro	Val	Ala	Gln	Gly	Ala	Thr	Ala	Glu	Ile	Phe	Asp	Asp	
1090							1095				1100					
Ser	Cys	Cys	Asn	Gly	Thr	Leu	Arg	Lys	Pro	Val	Ala	Pro	His	Val	Gln	
1105							1110				1115				1120	
Glu	Asp	Ser	Ser	Thr	Gln	Arg	Tyr	Ser	Ala	Asp	Pro	Thr	Val	Phe	Ala	
			1125				1130				1135					
Pro	Glu	Arg	Ser	Pro	Arg	Gly	Glu	Leu	Asp	Glu	Glu	Gly	Tyr	Met	Thr	
			1140				1145				1150					
Pro	Met	Arg	Asp	Lys	Pro	Lys	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asn	Pro	Val	Glu	Glu	
			1155				1160				1165					
Asn	Pro	Phe	Val	Ser	Arg	Arg	Lys	Asn	Gly	Asp	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	
1170							1175				1180					
Asn	Pro	Glu	Tyr	His	Asn	Ala	Ser	Asn	Gly	Pro	Pro	Lys	Ala	Glu	Asp	
1185							1190				1195				1200	
Glu	Tyr	Val	Asn	Glu	Pro	Leu	Tyr	Leu	Asn	Thr	Phe	Ala	Asn	Thr	Leu	
			1205				1210				1215					
Gly	Lys	Ala	Glu	Tyr	Leu	Lys	Asn	Asn	Ile	Leu	Ser	Met	Pro	Glu	Lys	
			1220				1225				1230					
Ala	Lys	Lys	Ala	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Tyr	Trp	Asn	His	Ser	Leu	Pro	
1235							1240				1245					
Pro	Arg	Ser	Thr	Leu	Gln	His	Pro	Asp	Tyr	Leu	Gln	Glu	Tyr	Ser	Thr	
1250							1255				1260					
Lys	Tyr	Phe	Tyr	Lys	Gln	Asn	Gly	Arg	Ile	Arg	Pro	Ile	Val	Ala	Glu	
1265							1270				1275				1280	
Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ser	Glu	Phe	Ser	Leu	Lys	Pro	Gly	Thr	Val	Leu	
			1285				1290				1295					

Pro Pro Pro Pro Tyr Arg His Arg Asn Thr Val Val  
 1300 1305  
 <210> 68  
 <211> 1390  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <223> HGFR/c-Met全长(前体)  
 <300>  
 <308> UniProt编号P08581  
 <309> 1988-08-01  
 <400> 68  
 Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys  
 20 25 30  
 Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala  
 35 40 45  
 Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu  
 50 55 60  
 Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys  
 65 70 75 80  
 Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe  
 85 90 95  
 Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp  
 100 105 110  
 Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp  
 115 120 125  
 Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His  
 130 135 140  
 Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys  
 145 150 155 160  
 Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val  
 165 170 175  
 Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe  
 180 185 190  
 Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp  
 195 200 205  
 His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp

210	215	220
Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu		
225	230	235
Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn		
245	250	255
Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln		
260	265	270
Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu		
275	280	285
His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg		
290	295	300
Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala		
305	310	315
Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser		
325	330	335
Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp		
340	345	350
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys		
355	360	365
Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg		
370	375	380
Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg		
385	390	395
Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr		
405	410	415
Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly		
420	425	430
Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly		
435	440	445
Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln		
450	455	460
Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu		
465	470	475
Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu		
485	490	495
Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys		
500	505	510
Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln		
515	520	525

Cys	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Phe	Val	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asp	Lys
530															
Cys	Val	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Gln	Ile
545															
Cys	Leu	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Asn	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg
Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu
Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys
Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Met	Asn	Lys	His	Phe	Asn	Met	Ser	Ile	Ile	Ile
625															
Ser	Asn	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Val	Asp
Pro	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Pro	Met	Ala	Gly	Gly
Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg
His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asn
Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe
705															
Ala	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe
Ser	Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Ile	Val	Tyr	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	Ser
Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Gly	Lys	Asn	Leu	Asn
Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala	Gly	Arg
Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys
785															
Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys
Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	Met	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	Tyr	Phe	Asp
Leu	Ile	Tyr	Val	His	Asn	Pro	Val	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Lys	Pro	Val

835	840	845
Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp		
850	855	860
Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys		
865	870	875
Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val		
885	890	895
Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys		
900	905	910
Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp		
915	920	925
Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala		
930	935	940
Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln		
945	950	955
Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His		
965	970	975
Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr		
980	985	990
Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro		
995	1000	1005
Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val		
1010	1015	1020
Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser		
1025	1030	1035
Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser		
1045	1050	1055
Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly		
1060	1065	1070
Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His		
1075	1080	1085
Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys		
1090	1095	1100
Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu		
1105	1110	1115
Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His		
1125	1130	1135
Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser		
1140	1145	1150



Pro Leu Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe			
1155	1160	1165	
Ile Arg Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe			
1170	1175	1180	
Gly Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe			
1185	1190	1195	1200
Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe			
1205	1210	1215	
Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys			
1220	1225	1230	
Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys			
1235	1240	1245	
Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser			
1250	1255	1260	
Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly			
1265	1270	1275	1280
Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu			
1285	1290	1295	
Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu			
1300	1305	1310	
Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro			
1315	1320	1325	
Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe			
1330	1335	1340	
Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys			
1345	1350	1355	1360
Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp			
1365	1370	1375	
Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser			
1380	1385	1390	

<210> 69  
 <211> 1367  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <223> IGF-1 R全长(前体)  
 <300>  
 <308> UniProt编号P08069  
 <309> 1988-08-01

&lt;400&gt; 69

Met	Lys	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu
1				5					10					15	
Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Trp	Pro	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile
			20					25					30		
Cys	Gly	Pro	Gly	Ile	Asp	Ile	Arg	Asn	Asp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Arg
		35					40					45			
Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Ile
	50					55					60				
Ser	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe	Pro	Lys	Leu	Thr	Val
65				70					75					80	
Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu
			85					90					95		
Gly	Asp	Leu	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Phe
		100					105					110			
Tyr	Asn	Tyr	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asp	Ile
	115					120					125				
Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala	Ile	Arg	Ile	Glu
	130					135				140					
Lys	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile
145				150					155					160	
Leu	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro	Lys
			165				170					175			
Glu	Cys	Gly	Asp	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr	Met	Glu	Glu	Lys	Pro	Met	Cys
		180					185					190			
Glu	Lys	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys	Trp	Thr	Thr
	195					200					205				
Asn	Arg	Cys	Gln	Lys	Met	Cys	Pro	Ser	Thr	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Cys
	210					215				220					
Thr	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser
225				230					235					240	
Ala	Pro	Asp	Asn	Asp	Thr	Ala	Cys	Val	Ala	Cys	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr
			245				250					255			
Ala	Gly	Val	Cys	Val	Pro	Ala	Cys	Pro	Pro	Asn	Thr	Tyr	Arg	Phe	Glu
		260					265				270				
Gly	Trp	Arg	Cys	Val	Asp	Arg	Asp	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile	Leu	Ser	Ala
	275					280					285				
Glu	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly	Phe	Val	Ile	His	Asp	Gly	Glu	Cys	Met
	290					295					300				

Gln	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ser	Met	Tyr
305					310					315					320
Cys	Ile	Pro	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Val	Cys	Glu	Glu	Glu	Lys
					325					330					335
Lys	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Met	Leu	Gln	Gly
					340					345					350
Cys	Thr	Ile	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Asn
					355										360
Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Val
					370										375
Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	His	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ser
385															390
Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Gly
					405										410
Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Trp
					420										425
Asp	Trp	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe
					435										440
Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu
					450										455
Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg
465															470
Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr
					485										490
Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr
					500										505
Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys
					515										520
Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys
					530										535
Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys
545															550
Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln
					565										570
Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp
					580										585
His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala
					595										600
Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser
															605

610	615	620
Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn		
625	630	635
Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr		
645	650	655
Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys		
660	665	670
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys		
675	680	685
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys		
690	695	700
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys		
705	710	715
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu		
725	730	735
Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser		
740	745	750
Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro		
755	760	765
Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn		
770	775	780
Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg		
785	790	795
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser		
805	810	815
Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp		
820	825	830
Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile		
835	840	845
Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met		
850	855	860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val		
865	870	875
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu		
885	890	895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly		
900	905	910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr		
915	920	925

Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val			
930	935	940	
Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg			
945	950	955	960
Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val			
	965	970	975
Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp			
	980	985	990
Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly			
	995	1000	1005
Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys Asp			
	1010	1015	1020
Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala Ala Ser			
1025	1030	1035	1040
Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Glu			
	1045	1050	1055
Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Gln Gly			
	1060	1065	1070
Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr Arg Gly Asp Leu Lys			
	1075	1080	1085
Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met Glu Asn Asn Pro Val Leu			
	1090	1095	1100
Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala			
1105	1110	1115	1120
Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu			
	1125	1130	1135
Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly			
	1140	1145	1150
Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys			
	1155	1160	1165
Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu			
	1170	1175	1180
Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val			
1185	1190	1195	1200
Val Leu Trp Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu			
	1205	1210	1215
Ser Asn Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp			
	1220	1225	1230
Lys Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys			

1235	1240	1245
Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile Ser		
1250	1255	1260
Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser Phe Tyr		
1265	1270	1275
Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu Asp Leu Glu		1280
1285	1290	1295
Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser Ala Ser Ser Ser		
1300	1305	1310
Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His Lys Ala Glu Asn Gly		
1315	1320	1325
Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala Ser Phe Asp Glu Arg Gln		
1330	1335	1340
Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro		
1345	1350	1355
Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys		1360
1365		

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 间隔子(IgG4铰链)

&lt;400&gt; 70

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1

5

10

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 间隔子(IgG4铰链)

&lt;400&gt; 71

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct

36

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 铰链-CH3间隔子

<400> 72

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Gly	Gln	Pro	Arg
1				5				10					15		
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
			20					25					30		
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
			35					40					45		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			50					55				60			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
65					70				75					80	
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				85					90					95	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			100					105					110		
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									

<210> 73

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链-CH2-CH3间隔子

<400> 73

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe
1				5				10					15		
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			20					25					30		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			35					40					45		
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
			50					55				60			
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser
65					70				75					80	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
				85					90					95	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser
			100					105					110		

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
115	120	125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
130	135	140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
145	150	155
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	165	170
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu		
	180	185
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	195	200
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	210	215
Leu Ser Leu Gly Lys		220
225		
<210> 74		
<211> 282		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> IgD-铰链-Fc		
<400> 74		
Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala		
1	5	10
Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala		
	20	25
Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys		
	35	40
Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro		
	50	55
Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln		
65	70	75
Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly		
	85	90
Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val		
	100	105
Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly		
	115	120
		125



Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn  
 130 135 140  
 Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys  
 165 170 175  
 Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser  
 180 185 190  
 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu  
 195 200 205  
 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro  
 210 215 220  
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser  
 225 230 235 240  
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr  
 245 250 255  
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg  
 260 265 270  
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His  
 275 280

<210> 75

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8α信号肽

<400> 75

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala

<210> 76

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 76

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro  
 1 5 10 15

Gly Pro

<210> 77

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 77

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 78

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 78

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val

65

<210> 79

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 79

Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
1				5					10					15	
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
				20				25					30		
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser							
				35				40							

<210> 80

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD28

<400> 80

Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
1				5					10					15	
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
				20				25					30		
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser							
				35				40							

<210> 81

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BB

<300>

<308> UniProt Q07011.1

<309> 1995-02-01

<400> 81

Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
1				5					10					15	
Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe
				20				25					30		

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35

40

<210> 82

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3ζ

<400> 82

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3ζ

<400> 83

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35

40

45

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

50

55

60

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

&lt;211&gt; 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 86

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1

5

10

15

Pro Gly Pro

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E2A

<400> 87

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1

5

10

15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 88

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F2A

<400> 88

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1

5

10

15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<220>

<221> 重复序列

<222> (5) ... (9)

<223> SGGGG被重复了5次

<400> 89

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 90

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 91

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的HER2t

<400> 91

tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtacct gttttggacc ggaggctgac 60  
cagtgtgtgg cctgtgcca ctataaggac cctcccttct gcgtggcccg ctgccccagc 120  
gggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgccc atctggaagt ttccagatga ggaggcgca 180  
tgccagcctt gccccatcaa ctgcaccac tcctgtgtgg acctggatga caagggtgc 240  
cccgccgagc agagagccag ccctctgacg ggtggaggaa gcggagggtg cagctccatc 300  
atctctgcgg tggttggcat tctgctggtc gtggtcttgg gggtggtctt tgggatcctc 360  
atc 363

<210> 92

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的HER2t

<400> 92

Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly

1 5 10 15

Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro

20 25 30

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

<210> 93

<211> 429

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有信号序列的经修饰的HER2t

<400> 93

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg 60  
 atcccatgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 120  
 gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgcgtgc 180  
 cccagcgggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccattc ggaagtttcc agatgaggag 240  
 ggcgcattgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 300  
 ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgggtg gaggaagcgg aggtggcagc 360  
 tccatcatct ctgcggtggt tggcattctg ctggtcgtgg tcttgggggt ggtctttggg 420  
 atcctcatc 429

<210> 94

<211> 750

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PSMA WT

<400> 94

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe  
 20 25 30  
 Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu



35	40	45
Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu		
50	55	60
Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile		
65	70	75
Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile		
85	90	95
Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His		
100	105	110
Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile		
115	120	125
Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe		
130	135	140
Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro		
145	150	155
Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr		
165	170	175
Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met		
180	185	190
Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val		
195	200	205
Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly		
210	215	220
Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys		
225	230	235
Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly		
245	250	255
Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr		
260	265	270
Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly		
275	280	285
Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys		
290	295	300
Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg		
305	310	315
Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn		
325	330	335
Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val		
340	345	350

Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro		
355	360	365
Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly		
370	375	380
Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg		
385	390	395
Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile		
	405	410
		415
Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr		
	420	425
		430
Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala		
	435	440
		445
Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val		
450	455	460
Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu		
465	470	475
		480
Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser		
	485	490
		495
Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile		
	500	505
		510
Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu		
	515	520
		525
Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn		
530	535	540
Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu		
545	550	555
		560
Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val		
	565	570
		575
Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val		
	580	585
		590
Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala		
	595	600
		605
Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr		
610	615	620
Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr		
625	630	635
		640
Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser		
	645	650
		655
Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu		

660	665	670
Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly	Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg	
675	680	685
His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser	His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser	
690	695	700
Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe	Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp	
705	710	715
Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys	Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala	
725	730	735
Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr	Leu Ser Glu Val Ala	
740	745	750
<210> 95		
<211> 750		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PSMA W2G		
<400> 95		
Met Gly Asn Leu Leu His Glu Thr Asp	Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg	
1	5	10
Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala	Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe	
20	25	30
Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp	Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu	
35	40	45
Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn	Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu	
50	55	60
Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe	Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile	
65	70	75
Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn	Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile	
85	90	95
Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu	Asp Ser Val Glu Leu Ala His	
100	105	110
Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn	Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile	
115	120	125
Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu	Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe	
130	135	140
Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn	Val Ser Asp Ile Val Pro Pro	
145	150	155
Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met	Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr	

					165					170					175				
Val	Asn	Tyr	Ala	Arg	Thr	Glu	Asp	Phe	Phe	Lys	Leu	Glu	Arg	Asp	Met				
					180					185					190				
Lys	Ile	Asn	Cys	Ser	Gly	Lys	Ile	Val	Ile	Ala	Arg	Tyr	Gly	Lys	Val				
					195					200					205				
Phe	Arg	Gly	Asn	Lys	Val	Lys	Asn	Ala	Gln	Leu	Ala	Gly	Ala	Lys	Gly				
					210					215					220				
Val	Ile	Leu	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Pro	Gly	Val	Lys				
225					230					235					240				
Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Trp	Asn	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Arg	Gly				
					245					250					255				
Asn	Ile	Leu	Asn	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Pro	Gly	Tyr				
					260					265					270				
Pro	Ala	Asn	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gly	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Gly				
					275					280					285				
Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Gln	Lys				
290					295					300									
Leu	Leu	Glu	Lys	Met	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Trp	Arg				
305					310					315					320				
Gly	Ser	Leu	Lys	Val	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Asn				
					325					330					335				
Phe	Ser	Thr	Gln	Lys	Val	Lys	Met	His	Ile	His	Ser	Thr	Asn	Glu	Val				
					340					345					350				
Thr	Arg	Ile	Tyr	Asn	Val	Ile	Gly	Thr	Leu	Arg	Gly	Ala	Val	Glu	Pro				
					355					360					365				
Asp	Arg	Tyr	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	His	Arg	Asp	Ser	Trp	Val	Phe	Gly				
					370					375					380				
Gly	Ile	Asp	Pro	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Val	Val	His	Glu	Ile	Val	Arg				
385					390					395					400				
Ser	Phe	Gly	Thr	Leu	Lys	Lys	Glu	Gly	Trp	Arg	Pro	Arg	Arg	Thr	Ile				
					405					410					415				
Leu	Phe	Ala	Ser	Trp	Asp	Ala	Glu	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	Thr				
					420					425					430				
Glu	Trp	Ala	Glu	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Arg	Gly	Val	Ala				
					435					440					445				
Tyr	Ile	Asn	Ala	Asp	Ser	Ser	Ile	Glu	Gly	Asn	Tyr	Thr	Leu	Arg	Val				
450					455					460									
Asp	Cys	Thr	Pro	Leu	Met	Tyr	Ser	Leu	Val	His	Asn	Leu	Thr	Lys	Glu				
465					470					475					480				

Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser		
	485	490 495
Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile		
	500	505 510
Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu		
	515	520 525
Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn		
	530	535 540
Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu		
545	550	555 560
Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val		
	565	570 575
Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val		
	580	585 590
Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala		
	595	600 605
Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr		
	610	615 620
Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr		
625	630	635 640
Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser		
	645	650 655
Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu		
	660	665 670
Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg		
	675	680 685
His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser		
	690	695 700
Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp		
705	710	715 720
Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala		
	725	730 735
Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala		
	740	745 750

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 2250

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PSMA WT

&lt;400&gt; 96

```

atgtggaatc tccttcacga aaccgactcg gctgtggcca ccgcgcgccg cccgcgctgg 60
ctgtgcgctg gggcgctggt gctggcgggt ggcttctttc tcctcggctt cctcttcggg 120
tggtttataa aatcctccaa tgaagctact aacattactc caaagcataa tatgaaagca 180
tttttgatg aattgaaagc tgagaacatc aagaagttct tatataattt tacacagata 240
ccacatttag caggaacaga aaaaaacttt cagcttgcaa agcaaattca atcccagtgg 300
aaagaatttg gcctggattc tgttgagcta gcacattatg atgtcctgtt gtcctacca 360
aataagactc atcccaacta catctcaata attaatgaag atggaaatga gattttcaac 420
acatcattat ttgaaccacc tcctccagga tatgaaaatg tttcggatat tgtaccacct 480
ttcagtgtt tctctcctca aggaatgcca gagggcgatc tagtgtatgt taactatgca 540
cgaactgaag acttctttaa attggaacgg gacatgaaa tcaattgctc tgggaaaatt 600
gtaattgcca gatatgggaa agttttcaga ggaaataagg ttaaaaatgc ccagctggca 660
ggggccaaag gagtcatctt ctactccgac cctgctgact actttgctcc tggggtgaag 720
tcctatccag atggttgga tcttcctgga ggtggtgtcc agcgtggaaa ttcctaaat 780
ctgaatgggtg caggagaccc tctcacacca ggttaccag caaatgaata tgcttatagg 840
cgtggaattg cagaggctgt tggctctcca agtattcctg ttcattcaat tggatactat 900
gatgcacaga agctcctaga aaaaatgggt ggctcagcac caccagatag cagctggaga 960
ggaagtctca aagtgcccta caatgttgga cctggcttta ctggaaactt ttctacacaa 1020
aaagtcaaga tgcacatcca ctctaccaat gaagtgacaa gaatttaca tgtgataggt 1080
actctcagag gagcagtga accagacaga tatgtcattc tgggaggtca ccgggactca 1140
tgggtgtttg gtggtattga ccctcagagt ggagcagctg ttgttcatga aattgtgagg 1200
agctttggaa cactgaaaaa ggaagggtgg agacctagaa gaacaatttt gtttgcaagc 1260
tgggatgcag aagaatttg tcttcttggt tctactgagt gggcagagga gaattcaaga 1320
ctccttcaag agcgtggcgt ggcttatatt aatgctgact catctataga aggaaactac 1380
actctgagag ttgattgtac accgctgatg tacagcttgg tacacaacct aacaaaagag 1440
ctgaaaagcc ctgatgaagg ctttgaaggc aaatctcttt atgaaagttg gactaaaaaa 1500
agtccttccc cagagttcag tggcatgccc aggataagca aattgggatc tggaaatgat 1560
tttgagggtg tcttccaacg acttgaatt gcttcaggca gagcacggtg tactaaaaat 1620
tgggaaacaa acaaattcag cggtatcca ctgtatcaca gtgtctatga aacatatgag 1680
ttggtggaaa agttttatga tccaatgttt aaatatcacc tcaactgtggc ccaggttcga 1740
ggagggatgg tgtttgagct agccaattcc atagtgtcc cttttgattg tcgagattat 1800
gctgtagttt taagaaagta tgctgacaaa atctacagta tttctatgaa acatccacag 1860
gaaatgaaga catacagtgt atcatttgat tcaacttttt ctgcagtaaa gaattttaca 1920
gaaattgctt ccaagtccag tgagagactc caggactttg aaaaagcaa cccaatagta 1980
ttaagaatga tgaatgatca actcatgttt ctggaaagag catttattga tccattaggg 2040
ttaccagaca ggcttttta taggcatgtc atctatgctc caagcagcca caacaagtat 2100
gcaggggagt cattcccagg aatttatgat gctctgtttg atattgaaag caaagtggac 2160
ccttccaagg cctggggaga agtgaagaga cagatttatg ttgcagcctt cacagtgcag 2220

```

gcagctgcag agactttgag tgaagtagcc

2250

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 2253

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 不含CpG的PSMA

&lt;400&gt; 97

```

atgtggaatc tccttcatga aacagactct gctgtggcca cagccagaag acccagatgg 60
ctgtgtgctg gggccctggg gctggctggg ggcttctttc tcctgggctt cctctttggg 120
tggtttataa aatcctccaa tgaagctact aacattactc caaagcataa tatgaaagca 180
tttttggatg aattgaaagc tgagaacatc aagaagttct tatataattt tacacagata 240
ccacatttag caggaacaga acaaaacttt cagcttgcaa agcaaattca atcccagtg 300
aaagaatttg gcctggattc tgttgagcta gcacattatg atgtcctgtt gtcctacce 360
aataagactc atcccaacta catctcaata attaataag atggaaatga gattttcaac 420
acatcattat ttgaaccacc tcctccagga tatgaaaatg tttctgatat tgtaccacct 480
ttcagtgtt tctctcctca aggaatgcca gagggagatc tagtgtatgt taactatgca 540
agaactgaag acttctttaa attggaaagg gacatgaaaa tcaattgctc tgggaaaatt 600
gtaattgcca gatatgggaa agttttcaga ggaaataagg ttaaaaatgc ccagctggca 660
ggggccaaag gagtcattct ctactctgac cctgctgact actttgctcc tggggtgaag 720
tcctatccag atggttggaa tcttcctgga ggtggtgtcc agagaggaaa taccctaaat 780
ctgaatgggtg caggagaccc tctcacacca ggttaccag caaatgaata tgcttatagg 840
agaggaattg cagaggctgt tggctctcca agtattcctg ttcattcaat tggatactat 900
gatgcacaga agctcctaga aaaaatgggt ggctcagcac caccagatag cagctggaga 960
ggaagtctca aagtgcccta caatgttggg cctggcttta ctggaaactt ttctacacaa 1020
aaagtcaaga tgcacatcca ctctaccaat gaagtgacaa gaatttaciaa tgtgatagg 1080
actctcagag gagcagtgga accagacaga tatgtcattc tgggaggtca cagggactca 1140
tgggtgtttg gtgtattga ccctcagagt ggagcagctg ttgttcatga aattgtgagg 1200
agctttggaa cactgaaaaa ggaagggtgg agacctagaa gaacaatttt gtttgcaagc 1260
tgggatgcag aagaatttgg tcttcttggg tctactgagt gggcagagga gaattcaaga 1320
ctccttcaag agaggggagt ggcttatatt aatgctgact catctataga aggaaactac 1380
actctgagag ttgattgtac accctgatg tacagcttgg tacacaacct aacaaaagag 1440
ctgaaaagcc ctgatgaagg ctttgaaggc aaatctcttt atgaaagttg gactaaaaaa 1500
agtccttccc cagagttcag tggcatgccc aggataagca aattgggatc tggaaatgat 1560
tttgaggtgt tcttccaaag acttggaaat gcttcaggca gagcaaggta tactaaaaat 1620
tgggaaacaa acaaaattcag tggttatcca ctgtatcaca gtgtctatga aacatatgag 1680
ttggtggaaa agttttatga tccaatgttt aaatatcacc tcactgtggc ccaggttaga 1740
ggagggatgg tgtttgagct agccaattcc atagtgtcc cttttgattg tagagattat 1800
gctgtagttt taagaaagta tgctgacaaa atctacagta tttctatgaa acatccacag 1860

```

gaaatgaaga catacagtgt atcatttgat tcactttttt ctgcagtaaa gaattttaca 1920  
gaaattgctt ccaagttcag tgagagactc caggactttg acaaaagcaa cccaatagta 1980  
ttaagaatga tgaatgatca actcatgttt ctggaaagag catttattga tccattaggg 2040  
ttaccagaca ggccttttta taggcatgtc atctatgctc caagcagcca caacaagtat 2100  
gcaggggagt cattcccagg aatttatgat gctctgtttg atattgaaag caaagtggac 2160  
ccttccaagg cctggggaga agtgaagaga cagatttatg ttgcagcctt cacagtgcag 2220  
gcagctgcag agactttgag tgaagtagcc taa 2253

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可切割接头

<400> 98

Pro Leu Gly Leu Trp Ala

1 5

<210> 99

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 99

Gly Phe Leu Gly

1

<210> 100

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽毒素

<400> 100

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys

1 5 10



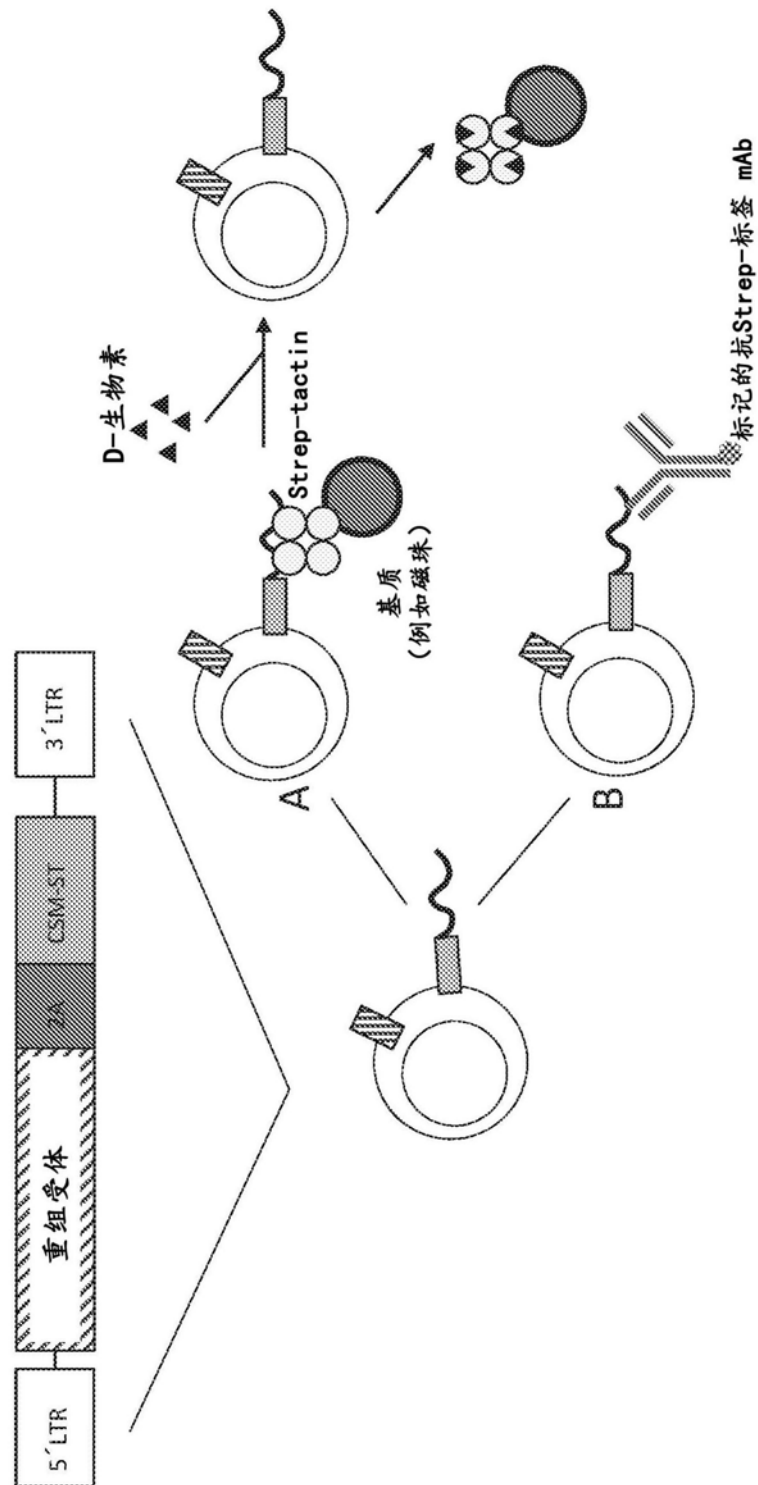


图1

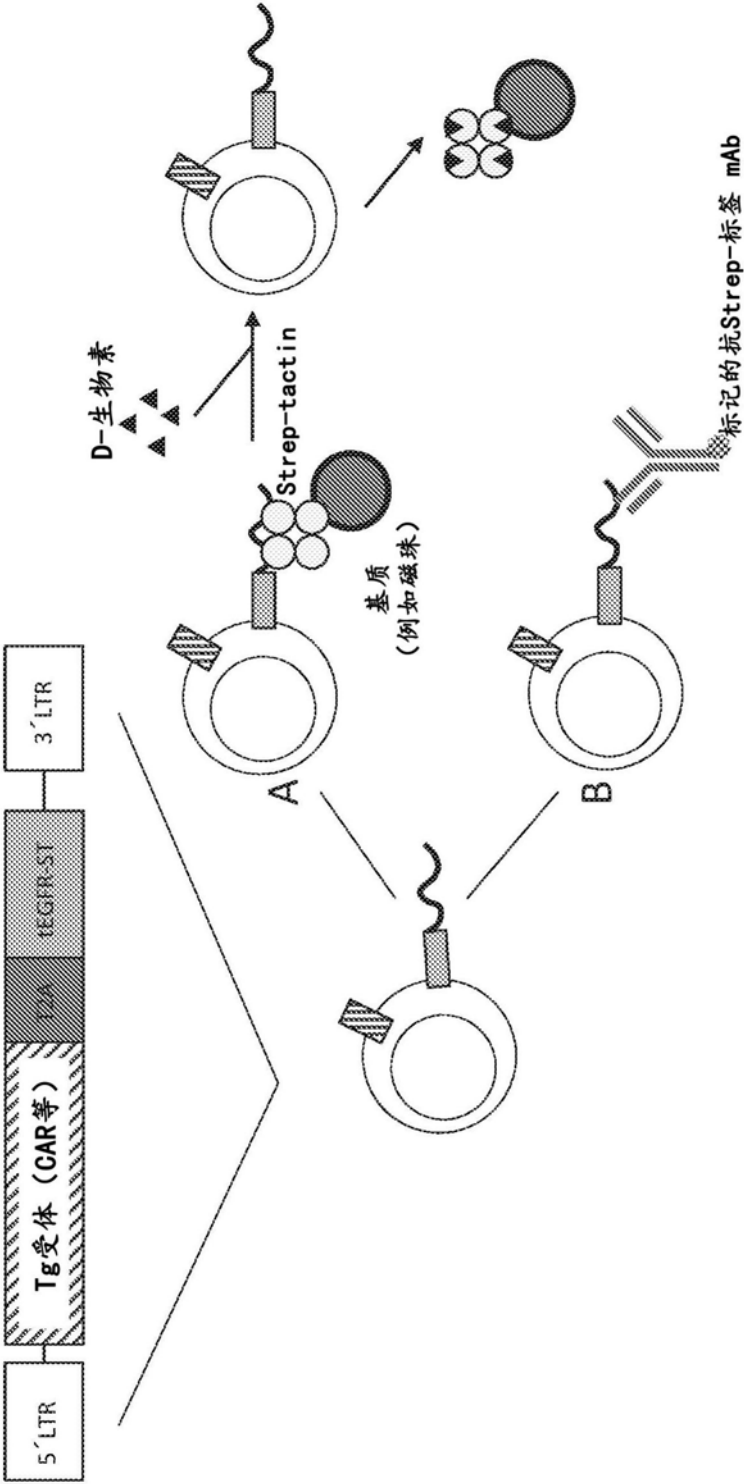


图2