



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110997719 B

(45) 授权公告日 2020.12.11

(21) 申请号 201880032715.1

(22) 申请日 2018.03.23

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110997719 A

(43) 申请公布日 2020.04.10

(30) 优先权数据  
62/476,438 2017.03.24 US  
62/620,139 2018.01.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.11.18

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2018/024183 2018.03.23

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/175988 EN 2018.09.27

(73) 专利权人 莱蒂恩技术公司

地址 美国马里兰州

专利权人 美国政府卫生与公众服务部

(72) 发明人 迪米特尔·S·迪米特罗夫  
里马斯·奥伦塔什 迪娜·施奈德  
博罗·德罗普利奇 朱忠玉

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 尹玉峰

(51) Int.Cl.  
C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 14/725 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)

审查员 张临政

权利要求书2页 说明书71页  
序列表49页 附图34页

(54) 发明名称

用于用抗CD33免疫疗法治疗癌症的组合物  
和方法

(57) 摘要

本公开内容涉及包含CD33抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR),包括核酸、重组表达载体、宿主细胞、抗原结合片段和药物组合物。还公开了在对象中治疗或预防癌症的方法和制备嵌合抗原受体T细胞的方法。提供了与来源于人CD8蛋白的跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 信号转导结构域偶联的7种不同CD33外部结构域的实验结果。

1. 编码嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的核酸分子, 所述嵌合抗原受体 (CAR) 从N端到C端包含:

(i) 至少一个细胞外抗原结合结构域, 所述细胞外抗原结合结构域包含由SEQ ID NO.1、3、5或11中的一个组成的核苷酸序列编码的CD33抗原结合结构域;

(ii) 跨膜结构域, 所述跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域: T细胞受体 (TCR)  $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154, 或其任意组合;

(iii) 至少一个共刺激结构域, 所述共刺激结构域包含选自以下的功能性信号转导结构域: OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB (CD137), 或其任意组合; 和

(iv) 细胞内信号转导结构域, 所述细胞内信号转导结构域包含选自以下的功能性结构域: 4-1BB (CD137)、CD28和CD3 $\zeta$ 信号转导结构域, 或其任意组合。

2. 载体, 其包含权利要求1所述的核酸分子。

3. 权利要求2所述的载体, 其中所述载体选自: DNA载体、RNA载体、质粒载体、黏粒载体、疱疹病毒载体、麻疹病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体, 或其组合。

4. 细胞, 其包含权利要求2所述的载体。

5. 药物组合物, 其包含抗肿瘤有效量的人T细胞群, 所述T细胞包含权利要求2所述的载体, 其中所述T细胞是患有癌症的人的T细胞, 其中所述癌症是白血病。

6. 包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物在制造用于在有此需要的对象中治疗表达CD33的癌症的药物中的用途, 其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列, 其中所述CAR从N端到C端包含:

(i) 至少一个细胞外抗原结合结构域, 所述细胞外抗原结合结构域包含含有选自SEQ ID NO.2、4、6和12的氨基酸序列的CD33抗原结合结构域;

(ii) 跨膜结构域, 所述跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域: TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154, 或其任意组合;

(iii) 至少一个共刺激结构域, 所述共刺激结构域包含选自以下的功能性信号转导结构域: OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB (CD137), 或其任意组合; 和

(iv) 细胞内信号转导结构域, 所述细胞内信号转导结构域包含选自以下的功能性结构域: 4-1BB (CD137)、CD28和CD3 $\zeta$ 信号转导结构域, 或其任意组合,

其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞, 其中所述癌症是白血病。

7. 权利要求6所述的用途, 其中所编码的CD33抗原结合结构域通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接。

8. 权利要求7所述的用途, 其中所编码的接头或间隔区结构域来源于CD8、TNFRSF19或CD28的细胞外结构域。

9. 权利要求6所述的用途, 其中所编码的细胞内信号转导结构域包含CD3 $\zeta$ 细胞内结构域。

10. 权利要求6所述的用途, 其中所述白血病是急性髓性白血病 (AML)、母细胞性浆细胞

样树突细胞肿瘤 (BPDCN)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞性T细胞白血病 (T-ALL) 或急性淋巴细胞性B细胞白血病 (B-ALL)。

## 用于用抗CD33免疫疗法治疗癌症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C.第119(e)节要求于2018年1月22日提交的美国临时专利申请No.62/620,139和2017年3月24日提交的美国临时专利申请No.62/476,438的优先权权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交,并通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2018年3月20日,命名为Sequence\_Listing.txt并且大小为124kb。

[0005] 关于联邦赞助的研究或开发的声明

[0006] 本发明是在与美国国立卫生研究院(卫生与公共服务部的一个机构)的合作研究与开发协议(Cooperative Research and Development Agreement)的执行中创造的。美国政府对本发明享有某些权利。

### 技术领域

[0007] 本申请涉及癌症领域,尤其涉及CD33抗原结合结构域和包含这样的CD33抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR)及其使用方法。

### 背景技术

[0008] 癌症是对人健康最致命的威胁之一。仅在美国,每年癌症影响接近130万例新患者,并且其是继心血管疾病之后死亡的第二位主要原因,引起约四分之一的死亡。实体瘤是这些死亡中大多数的原因。尽管在某些癌症的医学治疗方面已取得显著进展,但是在过去的20年内所有癌症的总体5年存活率仅提高约10%。癌症或恶性肿瘤转移并且以不受控制的方式迅速生长,使得治疗极其困难。

[0009] CD33是67 kDa跨膜细胞表面糖蛋白受体。CD33是唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin,SIGLEC)家族的成员。该家族中的蛋白质通过结合唾液酸化的聚糖来介导白细胞与内皮细胞的黏附。(Kelm S,Schauer R,Crocker PR.Glycoconj J.1996;13:913-926)。另外,CD33通过基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)充当抑制受体。CD33受体活化导致CD33细胞质尾中的两个酪氨酸(Y340和Y358)磷酸化,这是SHP磷酸酶的停泊位点(docking site),并参与抑制性信号转导级联,例如钙调动的下调(Paul SP1,Taylor LS,Stansbury EK,McVicar DW Blood.2000 Jul 15;96(2):483-90)。

[0010] CD33是一种髓系分化抗原,并且在髓样祖细胞上高表达(Andrews RG,Torok-Storb B,Bemstein ID.Blood.1983;62:124-132),但在分化的髓样细胞(即,巨噬细胞和粒细胞)中仅以低水平表达(Simmons D,Seed B.J Immunol.1988;141:2797-2800)。相比之下,据报道CD33在87.8%-99%的急性髓性白血病(AML)中表达(A Ehningerl等,Blood Cancer Journal (2014) 4,e218;Christina Krupka等,Blood 2014 123:356-365)。AML是一



种毁灭性疾病,其5年生存率为约26% (可在万维网cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-myeloid-aml/statistics获得)。当前的AML护理标准由以下组成:通过高剂量的化学疗法或放射进行缓解诱导治疗,然后进行巩固,包括同种异体干细胞移植和根据需要进行额外化学疗法过程 (可在万维网cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/treating/typical-treatment-of-aml.html获得)。与这种治疗相关的高毒性以及并发症的风险 (例如骨髓抑制或GVHD) 促使人们寻求更好的治疗选择。

[0011] 目前研究了治疗AML的许多新方法,包括抗体-药物缀合物 (SGN-CD33A, Vadastuximab Talirine, Stein A.S.等, (2015) .Blood, 126 (23) , 324; Phase I-II clinical trial NCT02706899)、双特异性T细胞衔接抗体 (AMG330, Laszlo GS等, Blood 2013; 123 (4) : 554-561, NCT02520427) 和CART-33细胞 (Wang QS等, Mol Ther. 2015 Jan; 23 (1) : 184-91, NCT01864902)。然而,由于临床毒性,多种新方法已被搁置。由于肝毒性的风险,测试SGN-CD33药物的西雅图遗传学I期临床试验 (Seattle Genetics Phase I clinical trials) 最近已被搁置 (可万维网businesswire.com/news/home/20161227005087/en/Seattle-Genetics-Announces-Clinical-Hold-Phase-1获得)。在上市后的临床试验中观察到潜在致命的静脉阻塞性肝病的发生后,制造商于2010年自愿将吉妥珠单抗 (Gemtuzumab ozogamicin) (Mylotarg, Pfizer/Wyeth) 从市场撤出 (Jacob M. Rowe 和 Bob Löwenberg Blood 2013 121: 4838-4841)。尽管FDA最近针对CD33+成人AML和复发/难治性儿科AML重新引入了Mylotarg,但是对该药物规定了新的更保守的较低剂量和新方案 (FDA press release 2017年9月,可在万维网fda.gov获得)。这种治疗的疗效、患者对Mylotarg的响应的持久性、肿瘤抗原逃逸的情况及其在新方案下的安全谱仍有待确定。因此,迫切需要用于AML的安全有效且持久的治疗。

[0012] 嵌合抗原受体 (CAR) 是包含以下三个基本单元的杂合分子: (1) 细胞外抗原结合基序、(2) 连接/跨膜基序和 (3) 细胞内T细胞信号转导基序 (Long AH, Haso WM, Orentas RJ. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. Oncoimmunology. 2013; 2 (4) : e23621)。CAR的抗原结合基序通常由单链可变片段 (single chain Fragment variable, ScFv): 免疫球蛋白 (Ig) 分子的最小结合结构域形成。还已改造了可替换的抗原结合基序,例如受体配体 (即,已将IL-13改造成与肿瘤表达的IL-13受体结合)、完整免疫受体、文库来源肽和先天免疫系统效应分子 (例如NKG2D)。用于CAR表达的可替换细胞靶标 (例如NK或  $\gamma$ - $\delta$  T细胞) 也在开发之中 (Brown CE等, Clin Cancer Res. 2012; 18 (8) : 2199-209; Lehner M等, PLoS One. 2012; 7 (2) : e31210)。关于限定最活跃的T细胞群以使用CAR载体进行转导、确定最佳的培养和扩增技术、以及限定CAR蛋白结构本身的分子细节仍然是大量的工作。

[0013] CAR的连接基序可以是相对稳定的结构域 (例如IgG的恒定结构域) 或被设计成延伸的柔性接头。结构基序 (例如来源于IgG恒定结构域的那些) 可以用于将ScFv结合结构域延伸远离T细胞质膜表面。这对于一些其中结合结构域与肿瘤细胞表面膜特别接近的肿瘤靶标而言可以是重要的 (例如对于二唾液酸神经节苷脂GD2而言; Orentas等, 未发表的观察结果)。迄今为止,用于CAR的信号转导基序通常包含CD3- $\zeta$ 链,因为该核心基序是T细胞活化的关键信号。首次报道的第二代CAR以CD28信号转导结构域和CD28跨膜序列为特征。该基序还用于包含CD137 (4-1BB) 信号转导基序的第三代CAR (Zhao Y等, J Immunol. 2009; 183 (9) :

5563-74)。随着新技术的出现,使用与抗CD3和抗CD28抗体连接的珠活化T细胞,且来自CD28的典型“信号2”的存在不再需要由CAR自身编码。通过使用珠活化,发现在体外测定中第三代载体并不优于第二代载体,并且在白血病的小鼠模型中其相对于第二代载体并未提供明显的益处(Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, FitzGerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Blood*. 2013;121(7):1165-74; Kochenderfer JN等, *Blood*. 2012;119(12):2709-20)。这通过为第二代CD28/CD3- $\zeta$  (Lee DW等, American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, LA; 2013年12月7日至12月10日)和CD137/CD3- $\zeta$ 信号转导形式(Porter DL等, *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-33)的CD19特异性CAR的临床成功得到证实。除CD137之外,其他肿瘤坏死因子受体超家族成员(例如OX40)也能够CAR转导的T细胞中提供重要的持续信号(Yvon E等, *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5852-60)。同样重要的是培养CAR T细胞群的培养条件。

[0014] 用于癌症的CAR疗法的更广泛且有效的适应中的目前的挑战与有力靶标的缺乏相关。建立细胞表面抗原的结合物现今是可容易实现的,但是发现对肿瘤具有特异性同时不伤害正常组织的细胞表面抗原仍然是艰巨的挑战。赋予CAR表达T细胞以更大靶细胞特异性的一种潜在方式是使用组合的CAR方法。在一种系统中,将CD3- $\zeta$ 和CD28信号单元分离在同一细胞内表达的两种不同CAR构建体中;在另一种系统中,在同一T细胞中表达两种CAR,但是是一种具有较低的亲和力并且因此需要另一种CAR首先进行衔接(engage)以使第二者具有完全活性(Lanitis E等, *Cancer Immunol Res*. 2013;1(1):43-53; Kloss CC等, *Nat Biotechnol*. 2013;31(1):71-5)。产生基于单ScFv的CAR作为免疫治疗剂的第二挑战是肿瘤细胞异质性。至少一个团队已经开发了用于胶质母细胞瘤的CAR策略,其中效应细胞群同时靶向多种抗原(HER2、IL-13Ra、EphA2),希望避免靶抗原阴性群的结果(Hegde M等, *Mol Ther*. 2013;21(11):2087-101)。

[0015] 基于T细胞的免疫治疗已经成为合成生物学中的新前沿;预见多种启动子和基因产物将这些高度有效的细胞引导到肿瘤微环境,在此T细胞不但可以避开负调节信号而且还可以介导有效的肿瘤杀伤。通过用AP1903进行诱导型胱天蛋白酶9构建体的药物诱导二聚化来消除不期望的T细胞表明其中可以在药理学上开启可以控制T细胞群的强大开关的一种方式(Di Stasi A等, *N Engl J Med*. 2011;365(18):1673-83)。通过诱饵受体的表达产生对转化生长因子 $\beta$ 的负调节效应具有免疫的效应T细胞群进一步表明可以针对最佳抗肿瘤活性改造效应T细胞的程度(Foster AE等, *J Immunother*. 2008;31(5):500-5)。因此,虽然看起来CAR可以以类似于内源性T细胞受体的方式触发T细胞活化,但是该技术的临床应用的主要障碍迄今为止受限于CAR+T细胞的体内扩增、输注后细胞的迅速消失和令人失望的临床活性。目前正在开发靶向CD33阳性肿瘤的多种基于抗体的模式,包括抗CD33抗体-药物缀合物(Stein A.S.等, *Blood*, 2015, 126(23), 324)、双特异性T细胞衔接物(BiTE)(Laszlo GS等, *Blood* 2013;123(4):554-561)和CAR T细胞(Wang QS等, *Mol Ther*. 2015 Jan;23(1):184-91)。在AML的临床前模型中的最新工作表明,可以在体外和体内以CD33靶向模式实现CD33阳性AML母细胞和肿瘤细胞系的裂解,但是在临床情况下这种方法的许多挑战变得明显,包括治疗相关的毒性(可在以下获得:万维网businesswire.com/news/

home/20161227005087/en/Seattle-Genetics-Announces-Clinical-Hold-Phase-1;Rowe JM和Löwenberg B, Blood 2013 121:4838-4841, Wang QS等, Mol Ther. 2015 Jan; 23(1): 184-91, NCT01864902) 和次优的效力 (Walter RB等, Blood. 2012; 119(26): 6198-6208; Cowan AJ等, Biosci 2013; 18(4): 1311-1334)。此外, 在基于BiTE的方法中, 对高密度CD33抗原表达的依赖以及为实现最佳BiTE功能需要另外的T细胞共刺激/检查点阻断仍然是挑战 (Laszlo GS等, Blood. 2014; 123(4): 554-56, Laszlo GS等, Blood Cancer Journal (2015) 5, e340)。因此, 在本领域中对于使用可以表现出特异性和有效的抗肿瘤作用而没有上述缺点的方法治疗AML的新组合物和方法存在迫切且长期的需求。

[0016] 本发明通过提供可以用于治疗癌症和其他疾病和/或病症的CAR组合物和治疗方法而解决这些需求。特别地, 如本文所公开和描述的本发明提供了可用于治疗与CD33表达失调有关的疾病、障碍或病症的CAR, 并且所述CAR包含CD33抗原结合结构域, 其在转导的T细胞上表现出高表面表达、表现出高度的细胞裂解和转导的T细胞体内扩增以及持续性。

## 发明内容

[0017] 本文提供了新的抗CD33抗体或其抗原结合结构域和包含这样的CD33抗原结合结构域的嵌合抗原受体 (CAR), 以及表达所述受体的宿主细胞 (例如T细胞), 和编码所述受体的核酸分子。CAR可由在效应细胞表面上表达的单个分子组成, 或者CAR包含效应细胞表达的信号转导模块和可溶性靶向模块, 例如当可溶性靶向模块与细胞表达的信号转导模块结合时, 形成完整的功能性CAR。CAR在转导的T细胞上表现出高表面表达, 具有高程度的细胞裂解和经转导的T细胞体内扩增和持久性。还提供了使用所公开的CAR、宿主细胞和核酸分子的方法, 例如在对象中治疗癌症。

[0018] 因此, 在一方面, 提供了编码人抗CD33抗体或其片段的分离的多核苷酸, 其包含选自SEQ ID NO: 1、3、5、7、9和11的核酸序列。

[0019] 在一个实施方案中, 提供了编码完全人抗CD33抗体或其片段的分离的多核苷酸, 其中所述抗体或其片段包含选自Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fv片段和单链Fv (ScFv) 的片段。

[0020] 在一个实施方案中, 提供了编码完全人抗CD33抗体或其片段的分离的多核苷酸, 其中所述抗体或其片段包含选自SEQ ID NO: 2、4、6、8、10和12的氨基酸序列。

[0021] 在一方面, 提供了编码嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的核酸分子, 所述嵌合抗原受体 (CAR) 从N端到C端包含至少一个CD33抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号转导结构域, 所述CD33抗原结合结构域由包含选自SEQ ID NO: 1、3、5、7、9和11的核酸序列的核苷酸序列编码。

[0022] 在一个实施方案中, 提供了编码CAR的分离的核酸分子, 其中所编码的细胞外CD33抗原结合结构域包含与CD33结合的抗体的至少一个单链可变片段。

[0023] 在另一个实施方案中, 提供了编码CAR的分离的核酸分子, 其中所编码的细胞外CD33抗原结合结构域包含与CD33结合的抗体的至少一个重链可变区。

[0024] 在一个实施方案中, CAR的靶向结构域以单克隆抗体、ScFv Fab、Fab' 2的形式独立表达并且包含与另外的结合标签或表位偶联的抗原靶向结构域, 所述抗原靶向结构域包含选自SEQ ID NO: 1、3、5、7、9和11的核酸序列, 而CAR的效应细胞表达组分包含结合结构域, 所述结合结构域特异性针对以结合可溶性CAR模块上表达的标签或表位, 例如CAR的可溶性

组分与CAR的细胞结合组分的特异性结合形成完整功能的CAR结构。

[0025] 在一个实施方案中,CAR的靶向结构域以单克隆抗体、ScFv Fab、Fab' 2的形式独立表达并且包含抗原靶向结构域和另外的scFv,所述抗原靶向结构域包含选自SEQ ID NO:1、3、5、7、9和11的核酸序列,而CAR的效应细胞表达组分包含标签或表位,所述标签或表位与可溶性CAR模块上表达的另外的scFv特异性反应,例如CAR的可溶性组分与CAR的细胞结合组分的特异性结合形成完整功能的CAR结构。

[0026] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的CAR细胞外CD33抗原结合结构域还包含至少一个与CD33结合的基于脂质运载蛋白(lipocalin)的抗原结合抗原(anticalin)。

[0027] 在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD33抗原结合结构域通过接头结构域与跨膜结构域连接。

[0028] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的CD33细胞外抗原结合结构域之前是编码前导肽或信号肽的序列。

[0029] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,所述CAR包含至少一个CD33抗原结合结构域,所述CD33抗原结合结构域由包含选自SEQ ID NO:1、3、5、7、9和11的核酸序列的核苷酸序列编码,并且其中CAR还编码靶向抗原的细胞外抗原结合结构域,所述抗原包括但不限于CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素(mesothelin)、CD33、CD38、CD123(IL3RA)、CD138、BCMA(CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR,或其任意组合。

[0030] 在某些实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中另外编码的细胞外抗原结合结构域包含抗CD19 ScFv抗原结合结构域、抗CD20 ScFv抗原结合结构域、抗CD22 ScFv抗原结合结构域、抗ROR1 ScFv抗原结合结构域、抗间皮素ScFv抗原结合结构域、抗CD33 ScFv抗原结合结构域、抗CD38 ScFv抗原结合结构域、抗CD123(IL3RA) ScFv抗原结合结构域、抗CD138 ScFv抗原结合结构域、抗BCMA(CD269) ScFv抗原结合结构域、抗GPC2 ScFv抗原结合结构域、抗GPC3 ScFv抗原结合结构域、抗FGFR4 ScFv抗原结合结构域、抗c-Met ScFv抗原结合结构域、抗PMSA ScFv抗原结合结构域、抗糖脂F77 ScFv抗原结合结构域、抗EGFRvIII ScFv抗原结合结构域、抗GD-2 ScFv抗原结合结构域、抗NY-ESO-1 TCR ScFv抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR ScFv抗原结合结构域,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或其任意组合。

[0031] 在一方面,本文提供的CAR还包含接头或间隔区结构域。

[0032] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所述细胞外CD33抗原结合结构域、所述细胞内信号转导结构域或二者通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接。

[0033] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的接头结构域来源于CD8或CD28的细胞外结构域,并且与跨膜结构域连接。

[0034] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的CAR还包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域: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和CD154,或其组合。

[0035] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的细胞内信号转导结构域还包含CD3 $\zeta$ 细胞内结构域。

[0036] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的细胞内信号转导结构域布置在相对于CD3 $\zeta$ 细胞内结构域的C端侧。

[0037] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个细胞内信号转导结构域包含共刺激结构域、初级信号转导结构域,或其组合。

[0038] 在另一些实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个共刺激结构域包含OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB (CD137) 的功能性信号转导结构域,或其组合。

[0039] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其还包含前导序列或信号肽,其中前导或信号肽核苷酸序列包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:43的核苷酸序列。

[0040] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的前导序列包含SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

[0041] 在一方面,本文提供了嵌合抗原受体 (CAR),其从N端到C端包含至少一个CD33抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号转导结构域。

[0042] 在一个实施方案中,提供了CAR,其中细胞外CD33抗原结合结构域包含与抗原结合的抗体的至少一个单链可变片段、或与抗原结合的抗体的至少一个重链可变区,或其组合。

[0043] 在另一个实施方案中,提供了CAR,其中至少一个跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域: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和CD154,或其组合。

[0044] 在一些实施方案中,提供了CAR,其中CAR另外编码细胞外抗原结合结构域,所述细胞外抗原结合结构域包含CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、CD33、CD38、CD123 (IL3RA)、CD138、BCMA (CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或其任意组合。

[0045] 在一个实施方案中,提供了CAR,其中细胞外抗原结合结构域包含抗CD19 ScFv抗原结合结构域、抗CD20 ScFv抗原结合结构域、抗CD22 ScFv抗原结合结构域、抗ROR1 ScFv抗原结合结构域、抗间皮素ScFv抗原结合结构域、抗CD33 ScFv抗原结合结构域、抗CD38 ScFv抗原结合结构域、抗CD123 (IL3RA) ScFv抗原结合结构域、抗CD138 ScFv抗原结合结构域、抗BCMA (CD269) ScFv抗原结合结构域、抗GPC2 ScFv抗原结合结构域、抗GPC3 ScFv抗原结合结构域、抗FGFR4 ScFv抗原结合结构域、抗c-Met ScFv抗原结合结构域、抗PMSA ScFv抗原结合结构域、抗糖脂F77 ScFv抗原结合结构域、抗EGFRvIII ScFv抗原结合结构域、抗GD-2 ScFv抗原结合结构域、抗NY-ESO-1 TCR ScFv抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR ScFv抗原结合结构域,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或其任意组合。

[0046] 在另一个实施方案中,提供了CAR,其中细胞外抗原结合结构域包含仅免疫球蛋白可变重链 (VH) 抗CD19抗原结合结构域、抗CD20 VH抗原结合结构域、抗CD22 VH抗原结合结构域、抗ROR1 VH抗原结合结构域、抗间皮素VH抗原结合结构域、抗CD33 VH抗原结合结构域、

域、抗CD38 VH抗原结合结构域、抗CD123 (IL3RA) VH抗原结合结构域、抗CD138 VH抗原结合结构域、抗BCMA (CD269) VH抗原结合结构域、抗GPC2 VH抗原结合结构域、抗GPC3 VH抗原结合结构域、抗FGFR4 VH抗原结合结构域、抗c-Met VH抗原结合结构域、抗PMSA VH抗原结合结构域、抗糖脂F77 VH抗原结合结构域、抗EGFRvIII VH抗原结合结构域、抗GD-2 VH抗原结合结构域、抗NY-ESO-1 TCR VH抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR VH抗原结合结构域,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或其任意组合。

[0047] 在另一个实施方案中,提供了CAR,其中细胞外抗原结合结构域包含能够特异性结合靶抗原的蛋白质或肽(P)序列,其可以来源于包含以下的天然或合成序列:抗CD19 P抗原结合结构域、抗CD20 P抗原结合结构域、抗CD22 P抗原结合结构域、抗ROR1 P抗原结合结构域、抗间皮素P抗原结合结构域、抗CD33 P抗原结合结构域、抗CD38 P抗原结合结构域、抗CD123 (IL3RA) P抗原结合结构域、抗CD138 P抗原结合结构域、抗BCMA (CD269) P抗原结合结构域、抗GPC2 P抗原结合结构域、抗GPC3 P抗原结合结构域、抗FGFR4 P抗原结合结构域、抗c-Met P抗原结合结构域、抗PMSA P抗原结合结构域、抗糖脂F77 P抗原结合结构域、抗EGFRvIII P抗原结合结构域、抗GD-2 P抗原结合结构域、抗NY-ESO-1 TCR P抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR P抗原结合结构域,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或其任意组合。在另一个实施方案中,提供了CAR,其中至少一个细胞内信号转导结构域包含共刺激结构域和初级信号转导结构域。

[0048] 在另一个实施方案中,提供了CAR,其中至少一个细胞内信号转导结构域包含共刺激结构域,所述共刺激结构域包含选自以下的蛋白质的功能性信号转导结构域:OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB (CD137),或其组合。

[0049] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:15的核酸序列 (LTG 1905 EF1a VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列(图2A))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CAR (LTG 1905 EF1a VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(图2A))。

[0050] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:17的核酸序列 (LTG 1906 EF1a-VH-4 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列(图2B))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CAR (LTG 1906 EF1a-VH-4 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(图2B))。

[0051] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:19的核酸序列 (LTG1936 EF1a ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$  CAR核苷酸序列(图2C))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CAR (LTG1936 EF1a ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ CAR氨基酸序列(图2C))。

[0052] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:21的核酸序列 (LTG1937 EF1a ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列(图2D))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CAR (LTG1937 EF1a ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3氨基酸序列(图2D))。

[0053] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:23的核酸序列 (LTG1938 EF1a ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列(图2E))。在一个实施方案中,核

酸序列编码包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CAR (LTG1938 EF1a ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(图2E))。

[0054] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:25的核酸序列 (LTG1939 EF1a\_ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列(图2F))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CAR (LTG1939 EF1a ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(图2F))。

[0055] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:69的核酸序列 (LTG1927 EF1a-CD33\_4 CD8 TM-CD28-CD3 $\zeta$ 核酸序列(图12A))。在一个实施方案中,该核酸序列编码包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CAR (LTG1927 EF1a-CD33\_4 CD8 TM-CD28-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(图12A))。

[0056] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:71的核酸序列 (LTG\_D0033Ef1a-CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28z核酸序列(图12B))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CAR (LTG\_D0033 (Ef1a-CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28z)氨基酸序列(图12B))。

[0057] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:73的核酸序列 (LTG\_D0034 Ef1a-CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_4-1BBz核酸序列(图12C))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CAR (LTG\_D0034 Ef1a-CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_4-1BBz氨基酸序列(图12C))。

[0058] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:87的核酸序列 (LTG\_D0035Ef1a\_CD33\_4 VH H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28z核酸序列(图12F))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CAR (LTG\_D0035 Ef1a\_CD33\_4 VH H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28z氨基酸序列(图12F))。

[0059] 在一方面,本文所公开的CAR被修饰以表达或包含可检测标志物从而用于诊断、监测和/或预测治疗结局(例如癌症患者的无进展存活)或用于监测这样的治疗的进展。

[0060] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:75的核酸序列 (LTG\_D0015 Ef1a-CD33\_4 VH CD8 BBz T2A tEGFR核酸序列(图12D))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CAR (LTG\_D0015 Ef1a-CD33\_4 VH CD8 BBz T2A tEGFR氨基酸序列(图12D))。

[0061] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:77的核酸序列 (LTG\_D0016 Ef1a-CD33\_4 VH CD8 28z T2A tEGFR核酸序列(图12E))。在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CAR (LTG\_D0015 Ef1a-CD33\_4 VH CD8 28z T2A tEGFR氨基酸序列(图12E))。

[0062] 在一个实施方案中,编码所公开CAR的核酸分子可以包含在载体,例如病毒载体中。载体是DNA载体、RNA载体、质粒载体、黏粒载体、疱疹病毒载体、麻疹病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体,或其组合。

[0063] 在某些实施方案中,所述载体还包含启动子,其中所述启动子是诱导型启动子、组织特异性启动子、组成型启动子、自杀型启动子(suicide promoter),或其任意组合。

[0064] 在另一个实施方案中,表达CAR的载体还可以被修饰以包含一个或更多个控制CAR T细胞表达或借助自杀开关来消除CAR-T细胞的操纵元件。自杀开关可以包括例如凋亡诱导

性信号转导级联或诱导细胞死亡的药物。在一个优选实施方案中,表达CAR的载体还可以被修饰以表达酶,例如胸苷激酶(thymidine kinase,TK)或胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase,CD)。

[0065] 在另一方面,还提供了包含编码CAR的核酸分子的宿主细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞是T细胞,例如从对象获得的原代T细胞。在一个实施方案中,所述宿主细胞是CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0066] 在另一方面,提供了包含抗肿瘤有效量的人T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个接头结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号转导结构域,所述细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2、4、6、8、10或12的氨基酸序列的CD33抗原结合结构域,其中所述T细胞是患有癌症的人的T细胞。所述癌症尤其包括血液学癌症,例如白血病(例如,慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia,CLL)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia,ALL)或慢性髓性白血病(chronic myelogenous leukemia,CML))、淋巴瘤(例如套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)或霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma))或多发性骨髓瘤,或其组合。

[0067] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其中CAR的至少一个跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、间皮素、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154,或其组合。

[0068] 在另一个实施方案中,提供了药物组合物,其中人癌症包括成体癌(adult carcinoma),其包括:口腔和咽癌(舌、口、咽、头和颈)、消化系统癌症(食管、胃、小肠、结肠、直肠、肛门、肝、肝内胆管、胆囊、胰腺)、呼吸系统癌症(喉、肺和支气管)、骨和关节癌、软组织癌症、皮肤癌(黑素瘤、基底细胞和鳞状细胞癌)、儿科肿瘤(神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、尤因肉瘤(Ewing's sarcoma))、中枢神经系统的肿瘤(脑、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、胶质瘤),以及乳腺、生殖系统(子宫颈、子宫体、卵巢、外阴、阴道、前列腺、睾丸、阴茎、子宫内膜)、泌尿系统(膀胱、肾和肾盂、输尿管)、眼和眼眶、内分泌系统(甲状腺)以及脑和其他神经系统的癌症,或其任意组合。

[0069] 在另一个实施方案中,提供了包含抗肿瘤有效量的患有癌症之人的人T细胞群的药物组合物,其中所述癌症是对一种或更多种化学治疗剂不具有响应性的难治性癌症。所述癌症包括造血性癌症(hematopoietic cancer),骨髓增生异常综合征,胰腺癌,头颈癌,皮肤肿瘤,以下中的微小残留病(minimal residual disease,MRD):急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(acute myeloid leukemia,AML)、成体B细胞恶性肿瘤(包括CLL(慢性淋巴细胞白血病)、CML(慢性髓性白血病)、非霍奇金淋巴瘤(NHL))、儿科B细胞恶性肿瘤(包括B谱系ALL(急性淋巴细胞白血病))、多发性骨髓瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、黑素瘤或其他血液学癌症和实体瘤,或其任意组合。

[0070] 在另一方面,提供了制备包含CAR的T细胞(下文中“CAR-T细胞”)的方法。该方法包括用编码与CD33特异性结合的所公开CAR的载体或核酸分子转导T细胞,从而制备CAR-T细胞。

[0071] 在另一方面,提供了产生RNA经改造的细胞群的方法,其包括将编码所公开CAR的核酸分子的体外转录RNA或合成RNA引入对象的细胞中,从而产生CAR细胞。



[0072] 在另一方面,提供了用于诊断与细胞上的CD33表达相关的疾病、障碍或病症的方法,其包括:a)使所述细胞与人抗CD33抗体或其片段接触,其中所述抗体或其片段包含选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10和12的氨基酸序列;以及b)检测CD33的存在,其中CD33的存在诊断与CD33表达相关的疾病、障碍或病症。

[0073] 在一个实施方案中,与CD33表达相关的疾病,病症或病症是癌症,包括造血性癌症,骨髓增生异常综合征,胰腺癌,头颈癌,皮肤肿瘤,以下中的微小残留病(MRD):急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、成体B细胞恶性肿瘤(包括CLL(慢性淋巴细胞白血病)、CML(慢性髓性白血病)、非霍奇金淋巴瘤(NHL))、儿科B细胞恶性肿瘤(包括B谱系ALL(急性淋巴细胞白血病))、多发性骨髓瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、黑素瘤或其他血液学癌症和实体瘤,或其任意组合。

[0074] 在另一个实施方案中,提供了哺乳动物中CD33相关疾病的诊断、预后或确定风险的方法,其包括检测来源于所述哺乳动物的样品中CD33的表达,其包括a)使所述样品与人抗CD33抗体或其片段接触,其中所述抗体或其片段包含选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10和12的氨基酸序列;以及b)检测CD33的存在,其中CD33的存在诊断所述哺乳动物中的CD33相关疾病。

[0075] 在另一个实施方案中,提供了抑制CD33依赖性T细胞抑制的方法,其包括使细胞与人抗CD33抗体或其片段接触,其中所述抗体或其片段包含选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10和12的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述细胞选自表达CD33的肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage),及其任意组合。

[0076] 在另一个实施方案中,提供了在哺乳动物中阻断由表达CD33的细胞介导的T细胞抑制并改变肿瘤微环境以抑制肿瘤生长的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的包含分离的抗CD33抗体或其片段的组合物,其中所述抗体或其片段包含选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10和12的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述细胞选自表达CD33的肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞,及其任意组合。

[0077] 在另一个实施方案中,提供了在哺乳动物中抑制、阻抑或阻止抗肿瘤或抗癌免疫应答的免疫抑制的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的包含分离的抗CD33抗体或其片段的组合物,其中所述抗体或其片段包含选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10和12的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体或其片段抑制第一细胞与T细胞之间的相互作用,其中所述第一细胞选自表达CD33的肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞,及其任意组合。

[0078] 在另一方面,提供了用于在哺乳动物中诱导抗肿瘤免疫的方法,其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的经编码所公开CAR之载体或核酸分子转导的T细胞。

[0079] 在另一个实施方案中,提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,其包括以在所述哺乳动物中有效治疗或预防癌症的量向所述哺乳动物施用一种或更多种所公开的CAR。该方法包括在以下条件下向对象施用治疗有效量的表达与CD33和/或前述一种或更多种抗原特异性结合的所公开CAR的宿主细胞,所述条件足以在所述对象中形成CAR上抗原结合结构域与CD33和/或前述一种或更多种抗原的细胞外结构域的免疫复合物。

[0080] 在另一个实施方案中,提供了用于治疗患有与肿瘤抗原表达升高相关的疾病、障碍或病症的哺乳动物的方法,所述方法包括向所述对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含

至少一个细胞外CD33抗原结合结构域、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个细胞内信号转导结构域,所述细胞外CD33抗原结合结构域包含SEQ ID NO.2、4、6、8、10或12的氨基酸序列或其任意组合,并且其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。

[0081] 在另一个实施方案中,提供了用于在有此需要的对象中治疗癌症的方法,其包括向所述对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个CD33抗原结合结构域、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个细胞内信号转导结构域,所述CD33抗原结合结构域包含SEQ ID NO.2、4、6、8、10或12的氨基酸序列或其任意组合,其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。在前述方法的一些实施方案中,所述至少一个跨膜结构域包含跨膜的T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、间皮素、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154,或其组合。

[0082] 在另一个实施方案中,提供了用于在被诊断患有癌症的人中产生持续性经遗传改造T细胞群的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向人施用被遗传改造成表达CAR的T细胞,其中所述CAR包含至少一个CD33抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号转导结构域,所述CD33抗原结合结构域包含SEQ ID NO.2、4、6、8、10或12的氨基酸序列或其任意组合,其中在施用后,所述持续性经遗传改造T细胞群或所述T细胞的后代群在人中持续至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、2年或3年。

[0083] 在一个实施方案中,人中的后代T细胞包含记忆T细胞。在另一个实施方案中,所述T细胞是自体T细胞。

[0084] 在本文所述的所有方法的方面和实施方案中,与肿瘤抗原表达升高相关的任何前述癌症、疾病、障碍或病症都可以使用本文所公开的一种或更多种CAR来治疗或预防或改善。

[0085] 在另一方面,提供了用于制备如上所述的嵌合抗原受体T细胞或用于如上所述在对象中预防、治疗或改善任何与肿瘤抗原表达升高相关的癌症、疾病、障碍或病症的药盒(kit),其包含容器和用于使用所述药盒的说明书,所述容器包含上文所公开的核酸分子、载体、宿主细胞或组合物的任一种,或其任意组合。

[0086] 可以理解,CAR、宿主细胞、核酸和方法在本文详细描述的具体方面和实施方案之外也是可用的。本公开内容的前述特征和优点将从以下详细描述中变得更明显,该详细描述通过参照附图来进行。

[0087] 附图简述

[0088] 图1描绘了具有新的细胞外CD33抗原结合结构域序列的CAR的一般性结构域结构的示意图。嵌合抗原受体包含细胞外CD33结合免疫球蛋白单链可变片段(ScFv)结构域或仅免疫球蛋白重链可变片段(VH)结构域,来源于CD8(图1A、1B、1F、1G)、TNFRSF19(图1C、1D)、IgG4(图1E)的铰链结构域,来源于CD8(图1A、1B、1E、1F、1G)、TNFRSF19(图1C、1D)的跨膜结构域,来源于CD137/4-1BB(图1A、1C、1F)或CD28(图1B、1D、1E、1G)的细胞内信号转导共刺激结构域,以及CD3 $\zeta$ 信号转导结构域。一些双顺反子构建体通过核糖体跳跃2A序列并入了来源于截短的EGFR(tEGFR)的标签(图1F、1G)。

[0089] 图2描绘了包含新的细胞外CD33抗原结合结构域序列的多种嵌合抗原受体(CAR)。CAR的一般性方案包括从N端到C端的信号肽、抗CD33结合物可变重链片段或连接的单链可变片段(ScFv)、细胞外接头、跨膜、4-1BB、CD3 $\zeta$ 。图2A描绘了表达CAR的慢病毒载体,LTG 1905 EF1a VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列和编码的氨基酸序列。图2B描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG 1906 (EF1a-VH-4CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ ) 核酸序列和编码的氨基酸序列。图2C描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG1936 EF1a ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核苷酸序列和编码的氨基酸序列。图2D描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG1937 EF1a ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列和编码的氨基酸序列。图2E描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG1938 EF1a ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列和编码的氨基酸序列。图2F描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG1939 EF1a ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 核酸序列和编码的氨基酸序列。

[0090] 图3描绘了原代人T细胞中的抗CD33 CART表面表达。通过慢病毒转导产生了经由使用仅可变重链靶向结构域重定向至CD33肿瘤抗原的CAR T细胞。通过流式细胞术进行CART检测。将T细胞在冷的PBS-EDTA缓冲液中洗涤两次,并且用CD33-Fc肽然后用抗Fc-AF647试剂染色。在APC通道中在MACSQuant 10流式细胞仪上获取数据。NT未经转导的细胞,GFP阴性对照。

[0091] 图4描述了并入免疫球蛋白重链可变结构域结合物的抗CD33 CAR T细胞,证明了体外CD33阳性肿瘤的细胞裂解。将表达抗CD33构建体的CAR T细胞与用萤火虫萤光素酶稳定转导的高CD33 (HL-60)、中CD33 (K562) 和低CD33 (Reh) 靶标以5、10和20的效应物靶标比孵育过夜。然后,如材料和方法中所述,通过萤光素酶活性测量来评估CART细胞毒性活性。 $N=3+/-SEM$ 。

[0092] 图5描绘了基于VH的CD33特异性CART细胞在与CD33阳性白血病细胞系共培养时产生高水平的细胞因子。将抗CD33 CART细胞与高CD33 (THP-1, HL-60)、中CD33 (K562) 或低CD33 (Reh) 白血病细胞系以E:T比为10:1共孵育过夜,然后通过ELISA分析上清液的细胞因子浓度。 $N=3+/-SD$ 。阴性对照:NT未经转导的T细胞,1398-GFP转导的T细胞。

[0093] 图6描绘了原代人T细胞中的抗CD33 CART表面表达。通过慢病毒转导产生了经由使用ScFv靶向结构域重定向至CD33肿瘤抗原的CAR T细胞。通过流式细胞术进行CAR T检测。将T细胞在冷的PBS-EDTA缓冲液中洗涤两次,并且用CD33-Fc肽然后用抗Fc-AF647试剂染色。在APC通道中在MACSQuant 10流式细胞仪上获取数据。UTD未经转导的细胞,1398-GFP阴性对照。

[0094] 图7描绘了并入免疫球蛋白重链可变结构域结合物的抗CD33 CAR T细胞,证明了体外CD33阳性肿瘤的细胞裂解。将表达抗CD33构建体的CAR T细胞与用萤火虫萤光素酶稳定转导的高CD33 (HL-60, MOLM-14)、中CD33 (K562) 和低CD33 (Reh) 靶标以5、10和20的效应物靶标比孵育过夜。然后,如材料和方法中所述,通过萤光素酶活性测量来评估CART细胞毒性活性。 $N=3+/-SEM$ 。

[0095] 图8描绘了基于scFv和基于VH的CD33特异性CAR T细胞在与CD33阳性白血病细胞系共培养时产生高水平的细胞因子。将抗CD33CART细胞与高CD33 (HL-60, MOLM-14) 或低CD33 (Reh) 白血病细胞系以1:1的E:T比共孵育过夜,然后通过ELISA分析上清液的细胞因子浓度。 $N=3+/-SD$ 。阴性对照:UTD-未经转导的T细胞,1398-GFP转导的T细胞。

[0096] 图9描绘了表达多种抗CD33构建体的CAR T细胞与HL-60 CD33<sup>+</sup>肿瘤细胞的长期共孵育测定。将抗CD33 CAR T细胞系与HL-60 CD33<sup>+</sup>肿瘤细胞以指示的效应物靶标(E:T)比在培养物中合并,并维持11天。然后,收获共培养的细胞并通过流式细胞术获得。如材料和方法中所述,根据单次和侧向散射单峰对细胞进行设门,并通过7-AAD染色排除死细胞。方框表示每种条件下每种标记的存活HL-60<sup>+</sup>肿瘤细胞和CD3<sup>+</sup>CAR T细胞的百分比。UTD-未经转导的T细胞对照,1398-GFP转导的T细胞对照,E:T 1:0表示仅T细胞对照。

[0097] 图10描绘了使用生物发光成像在体内评估的靶向CD33的CAR T细胞的肿瘤排斥动力学。在第0天向NSG小鼠接种 $1.0 \times 10^6$ 个MOLM-14 CD33<sup>+</sup>AML细胞,并在研究第5天施用 $5.0 \times 10^6$ 个CAR T<sup>+</sup>细胞/小鼠。在第14-35天之间每周通过生物发光成像评估肿瘤负荷。A.平均辐射+/-SEM,N=6只小鼠/组。B.Kaplan-Meier曲线,描绘了在实验过程中每个实验组中存活的小鼠的百分比,N=6只小鼠/组。TA-仅肿瘤,UTD-未经转导的T细胞对照。

[0098] 图11描绘了体内评估的靶向CD33的CAR T细胞的功能。在第0天,向NSG小鼠接种 $1.0 \times 10^6$ 个MOLM-14 CD33<sup>+</sup>AML细胞,并在研究第5天施用 $5.0 \times 10^6$ 个CAR T<sup>+</sup>细胞/小鼠。在研究第19天从小鼠收集血液,并分析循环CAR T、肿瘤细胞和炎性细胞因子的水平。A.通过流式细胞术获得CAR T细胞和MOLM-14肿瘤细胞,使用CountBright珠确定绝对细胞数。B.通过MACS人多重珠阵列(MACS Human Multiplex Bead Array)对小鼠血浆中炎性细胞因子的水平进行评估。N=6只小鼠/组。TA-仅肿瘤,UTD-未经转导的T细胞对照。通过双因素方差分析和Dunnett事后检验进行组的比较。\*\*\*p<0.001,\*p<0.05,NS-不显著。

[0099] 图12描绘了在不同的CAR构型的情况下,包含新的细胞外VH CD33\_4抗原结合结构域序列的多种嵌合抗原受体(CAR)。CAR的一般性方案包括从N端到C端的信号肽、抗CD33结合物可变重链片段细胞外接头、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 活化结构域。一些序列包含在CAR序列下游的通过2A核糖体跳跃序列分隔的tEGFR标签肽。图12A描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG1927 EF1a CD33\_4 CD8 TM CD28 CD3 $\zeta$ 核酸序列和编码的氨基酸序列。图12B描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG\_D0033 EF1a CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28 $\zeta$ 核酸序列和编码的氨基酸序列。图12C描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG\_D0034 Ef1a\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_4-1BB CD3 $\zeta$ 核酸序列和编码的氨基酸序列。图12D描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG\_D0015 CD33\_4VH CD8 BB CD3 $\zeta$  T2A tEGFR核酸序列和编码的氨基酸序列。图12E描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG\_D0016 CD33\_4VH CD8 28 CD3 $\zeta$  T2A tEGFR核酸序列和编码的氨基酸序列。图12F描绘了表达CAR的慢病毒载体,其包含LTG\_D0035 Ef1a\_CD33\_4 VH H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28 CD3 $\zeta$ 核酸序列和编码的氨基酸序列。

[0100] 发明详述

[0101] 定义

[0102] 除非上下文明确另外指出,否则本文所用的没有数量词修饰的名词是指一个/种或更多个/种。例如,术语“抗原”包括一种或更多种抗原,并且可以被认为等同于短语“至少一种抗原”。本文所用的术语“包含”意指“包括”。由此,“包含抗原”意指“包括抗原”而不排除其他要素。短语“和/或”意指“和”或者“或”。还应理解的是,除非另外指出,否则针对核酸或多肽给出的任何和所有碱基尺寸或氨基酸尺寸,以及所有的分子重量或分子质量值都是近似的,并且是为了描述性目的而提供的。虽然可以使用许多与本文描述的方法和材料类

似或等同的方法和材料,但是具体的合适方法和材料在下文进行描述。在冲突的情况下,将以本说明书(包括术语的解释)为准。另外,材料、方法和实例仅是举例说明性的并非意图进行限制。为便于不同实施方案的综述,提供了以下术语解释:

[0103] 术语“约”当指可测量值(例如量、持续时间等)时意指涵盖与特定值的 $\pm 20\%$ 、或在一些情况下 $\pm 10\%$ 、或在一些情况下 $\pm 5\%$ 、或在一些情况下 $\pm 1\%$ 、或在一些情况下 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化适合于进行所公开的方法。

[0104] 除非另外指出,否则本文的技术术语是根据常规用法使用的。分子生物学中常用术语的定义可见于Benjamin Lewin, *Genes VII*, Oxford University Press出版,1999; Kendrew等,(编辑), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd. 出版,1994; 和Robert A. Meyers(编辑), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc. 出版,1995; 以及其他类似参考文献。

[0105] 本公开内容提供了CD33抗体或其片段以及具有这样的CD33抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR)。CAR的功能活性增强与CAR表达T细胞的功能活性增强直接相关。作为这些修饰中一种或更多种的结果, CAR表现出高度的细胞因子诱导裂解和转导T细胞上的细胞表面表达二者, 以及提高的体内T细胞扩增水平和转导CAR表达T细胞的持续性。

[0106] 将来源于不同蛋白质结构域的功能性部分组合的独特能力是嵌合抗原受体(CAR)的关键创新特征。这些蛋白质结构域中每一个的选择是关键设计特征, 其特异性组合的方式也如此。每个设计结构域都是可以在不同CAR平台之间使用以改造淋巴细胞的功能的必需组分。例如, 细胞外结合结构域的选择可以使在其他情况下无效的CAR变得有效。

[0107] 用于建立CAR的细胞外抗原结合结构域的免疫球蛋白来源蛋白质序列的恒定构架组分可以是完全中性的或其可以自缔合并驱使T细胞达到代谢衰竭的状态, 由此使表达该CAR的治疗性T细胞的效果远远更低。这独立于该CAR结构域的抗原结合功能而发生。此外, 细胞内信号转导结构域的选择也可以控制用于免疫疗法的治疗性淋巴细胞群的活性和持久性。尽管分别通过这些细胞外和细胞内结构域结合靶抗原的能力和向T细胞传递活化信号的能力是重要的CAR设计方面, 但是还变得明显的是, 细胞外抗原结合片段来源的选择可对CAR的效力产生显著影响, 从而对CAR的功能和临床效用具有限定作用。

[0108] 令人惊讶且预料不到的是, 现已发现在CAR中使用完全人抗原结合结构域而不是使用易于在宿主中诱导抗小鼠免疫应答和CAR T消除的小鼠来源的抗原结合片段(参见, the UPenn-sponsored clinical trial using mouse derived SS1 ScFv sequence, NCT02159716)也可决定表达CAR的T细胞的功能活性。

[0109] 本文中所公开的CAR在细胞中以高水平表达。表达CAR的细胞具有高体内增殖速率, 产生大量的细胞因子, 并且对表面上具有与CAR结合之CD33抗原的细胞具有高细胞毒活性。使用人细胞外CD33抗原结合结构域导致产生在体内更好地起作用的CAR, 同时避免了在宿主免疫应答中诱导抗CAR免疫, 以及杀伤CAR T细胞群。表达整个人细胞外CD33 ScFv抗原结合结构域的CAR表现出优异的活性/特性, 其包括: i) 防止如利用小鼠来源的结合序列所见的差的CAR T持久性和功能; ii) 使缺乏CAR的区域(即胸膜内)递送有效; 和iii) 基于对CD33具有高亲和力和低亲和力二者的结合物产生CAR T细胞设计的能力。后一种特性使研究者能够更好地调节CAR T产品的效力vs毒性, 和/或组织特异性, 这是因为由于与正常组

织相比肿瘤上更高的CD33表达,与正常组织相比,较低亲和力的结合物可具有更高的对肿瘤的特异性,这可防止脱靶肿瘤毒性(on-target off tumor toxicity)和旁观者细胞杀伤。

[0110] 以下是对本发明CAR的详细描述,包括对其细胞外CD33抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内结构域的描述,以及对CAR、抗体及其抗原结合片段、缀合物、核苷酸、表达、载体以及宿主细胞、治疗方法、组合物和使用所公开CAR的药盒的附加描述。

[0111] A. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0112] 本文所公开的CAR包含至少一个能够与CD33结合的CD33抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内结构域。

[0113] 嵌合抗原受体 (CAR) 是包含经由跨膜结构域与T细胞信号转导结构域连接的抗体之抗原结合结构域(例如单链可变片段 (ScFv)) 的人工构建杂合蛋白或多肽。CAR的特征包括其以非MHC限制性方式将T细胞特异性和反应性针对选定靶标重定向的能力,和利用单克隆抗体的抗原结合特性。非MHC限制性抗原识别赋予表达CAR的T细胞以独立于抗原加工识别抗原的能力,由此绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR有利地不与内源性T细胞受体 (TCR)  $\alpha$  和  $\beta$  链二聚化。

[0114] 如本文所公开的,CAR的细胞内T细胞信号转导结构域可以包含例如T细胞受体信号转导结构域、T细胞共刺激信号转导结构域、或这二者。T细胞受体信号转导结构域是指CAR中包含T细胞受体的细胞内结构域的部分,例如但不限于CD3 $\zeta$ 蛋白的细胞内部分。共刺激信号转导结构域是指CAR中包含共刺激分子的细胞内结构域的部分,所述共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效响应所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。

[0115] 1. 细胞外结构域

[0116] 在一个实施方案中,CAR包含靶标特异性结合元件,其还被称为抗原结合结构域或部分。结构域的选择取决于限定靶细胞的表面的配体的类型和数量。例如,可以选择抗原结合结构域以识别充当靶细胞上与特定疾病状态相关的细胞表面标志物的配体。因此,可以充当CAR中抗原结合结构域的配体的细胞表面标志物的一些实例包括与病毒性、细菌性和寄生物感染、自身免疫病和癌细胞相关的那些。

[0117] 在一个实施方案中,可以通过改造与肿瘤细胞上抗原特异性结合的期望抗原结合结构域来将CAR改造成靶向目的肿瘤抗原。肿瘤抗原是由肿瘤细胞产生的引发免疫应答、特别是T细胞介导的免疫应答的蛋白质。抗原结合结构域的选择将取决于待治疗癌症的特定类型。肿瘤抗原包括例如胶质瘤相关抗原、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、 $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白 (alphafetoprotein, AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2 (AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostein、PSMA、Her2/neu、存活素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (prostate-carcinoma tumor antigen-1, PCTA-1)、MAGE、ELF2M、中性粒细胞弹性蛋白酶、ephrinB2、CD22、胰岛素生长因子 (insulin growth factor, IGF) -I、IGF-II、IGF-I受体和CD33。本文所公开的肿瘤抗原仅仅通过示例的方式包括在内。该列表并不意味着是唯一的并且另一些实例对本领域技术人员而言将是明显的。

[0118] 在一个实施方案中,肿瘤抗原包含一个或更多个与恶性肿瘤相关的抗原性癌症表

位。恶性肿瘤表达多种可以作为免疫攻击的靶抗原的蛋白质。这些分子包括但不限于组织特异性抗原,例如黑素瘤中的MART-1、酪氨酸酶和GP 100,以及前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase,PAP)和前列腺特异性抗原(PSA)。另一些靶分子属于转化相关分子组,例如癌基因HER-2/Neu/ErbB-2。另一组靶抗原是癌-胚胎抗原例如癌胚抗原(CEA)。在B细胞淋巴瘤中,肿瘤特异性独特型免疫球蛋白构成个体肿瘤特有的真正肿瘤特异性的免疫球蛋白抗原。B细胞分化抗原(例如CD19、CD20和CD37)是B细胞淋巴瘤中靶抗原的另一些候选物。这些抗原中的一些(CEA、HER-2、CD19、CD20、独特型)已经用作使用单克隆抗体的被动免疫治疗的靶标,但成功有限。

[0119] 在一个优选实施方案中,肿瘤抗原是CD33,并且与CD33表达相关的肿瘤包括表达高水平细胞外蛋白CD33的肺癌间皮瘤、卵巢癌和胰腺癌,或其任意组合。

[0120] 肿瘤抗原的类型还可以是肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigen,TSA)或肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA)。TSA对肿瘤细胞而言是独特的并且不会出现在体内的其他细胞上。TAA对肿瘤细胞而言不是独特的并且作为替代还在不能诱导针对抗原的免疫耐受状态的条件下在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达可以在使免疫系统能够对抗原作出响应的条件下发生。TAA可以是在胎儿发育期间在正常细胞上表达的抗原,此时免疫系统是未成熟的并且不能作出响应,或者TAA可以是在正常情况下以极低水平存在于正常细胞上但在肿瘤细胞上以高得多水平表达的抗原。

[0121] TSA或TAA的非限制性实例包括以下:分化抗原,例如MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2,和肿瘤特异性多谱系抗原,例如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原例如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,例如p53、Ras、HER-2/neu;由染色体易位产生的独特肿瘤抗原,例如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;以及病毒抗原,例如EB病毒(Epstein Barr virus)抗原EBVA以及人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)抗原E6和E7。其他基于蛋白质的大抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 $\beta$ -联蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、 $\beta$ -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0122] 在一个实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分靶向包括但不限于以下的抗原:CD19、CD20、CD22、ROR1、CD33、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR等。

[0123] 在一个优选实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分靶向细胞外CD33抗原。

[0124] 在一个优选实施方案中,编码细胞外CD33 VH-2抗原结合结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD33 VH-2抗原结合结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0125] 在一个优选实施方案中,编码细胞外CD33 VH-4抗原结合结构域的分离的核酸分

子包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD33 VH-4抗原结合结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0126] 在一个优选实施方案中,编码细胞外CD33 ScFv 9抗原结合结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD33 ScFv 9抗原结合结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0127] 在一个优选实施方案中,编码细胞外CD33 ScFv 10抗原结合结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD33 ScFv 10抗原结合结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0128] 在一个优选实施方案中,编码细胞外CD33 ScFv 12抗原结合结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD33 ScFv 12抗原结合结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0129] 在一个优选实施方案中,编码细胞外CD33 ScFv 15抗原结合结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD33 ScFv 15抗原结合结构域包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0130] 本文所述的特异性CD33仅可变重链和ScFv抗原结合片段或抗原结合物的产生和结合特征显示在实施例1中。

[0131] 在本文公开的CD33特异性CAR的多个实施方案中,一般性方案在图1中示出,并且从N端到C端包含信号或前导肽、抗CD33 ScFv、细胞外接头、CD8跨膜、4-1BB、CD3 $\zeta$ ,其中粗体字表示用于连接结构域的克隆位点。

[0132] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:15的核酸序列,并且编码包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的CAR[LTG 1905 EF1a VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(如图2A所示)]。

[0133] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:15的核酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR[LTG 1905 EF1a VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(如图2A所示)]。

[0134] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:17的核酸序列,并且编码包含SEQ ID NO:18所示氨基酸序列的CAR[LTG 1906 EF1a-VH-4 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(如图2B所示)]。



[0135] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:17的核酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含SEQ ID NO:18所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR [LTG 1906 EF1a-VH-4 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(如图2B所示)]。

[0136] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:19的核酸序列,并且编码包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的CAR [LTG1936 EF1a ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$  CAR氨基酸序列(如图2C所示)]。

[0137] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:19的核酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR [LTG1936 EF1a ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$  CAR氨基酸序列(如图2C所示)]。

[0138] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:21的核酸序列,并且编码包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的CAR [LTG1937 EF1a ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3氨基酸序列(如图2D所示)]。

[0139] 在又一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:21的核酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR [LTG1937 EF1a ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3氨基酸序列(如图2D所示)]。

[0140] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:23的核酸序列,并且编码包含SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的CAR [LTG1938 EF1a ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(如图2E所示)]。

[0141] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:23的核酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含SEQ ID NO:24所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR [LTG1938 EF1a ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(如图2E所示)]。

[0142] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:25的核酸序列,并且编码包含SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的CAR [ (LTG1939 EF1a ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(如图2F所示)]。

[0143] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:25的核酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含SEQ ID NO:26所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR [ (LTG1939 EF1a ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列(如图2F所示)]。

[0144] 并入了与CD33抗原反应的免疫球蛋白重链可变结构域(VH)和单链可变片段(ScFv)序列的抗CD33 CAR的表面表达显示在下文实施例2中,并且总结在表2中。使用重组CD33-Fc肽,然后与AF647缀合的抗人Fc F(ab')<sub>2</sub>片段,并且在APC通道中检测来通过对来自健康供体的LV转导的T细胞进行流式细胞术分析来确定每种包含ScFv或VH的CAR的表达水平(参见实施例2,图3和6)。在来自两个供体的T细胞表面上容易检测到基于VH的抗CD33 CAR构建体1905和1906(黑色迹线),证明了T细胞转导的可重复性。相比之下,在阴性对照未经转导的T细胞(灰色迹线)和GFP对照(未示出)中未检出CAR表达,因此证明了所用检测方

法的特异性(参见实施例2,图3和表2)。类似地,与未经转导的T细胞对照(灰色迹线)相比,基于ScFv的抗CD33 CAR构建体1936、1937、1938和1939在人原代T细胞(黑色痕迹)中高表达。显示了一个供体的代表性结果。

[0145] 如实施例2的图4和图7所示,当产生表达以下CAR的慢病毒载体(LV)并测试其抗白血病活性时,证明了CD33 CAR的高细胞裂解活性。每个实验CAR包含本文指出的4-1BB/CD3- $\zeta$ 链信号转导基序和特异性抗CD33结合基序/结构域。使用了具有不同CD33表面表达的四个白血病靶细胞系:HL-60和MOLM-14(高),Reh和K562(低)。基于VH结构域的CAR-T构建体LTG1905和LTG1906使低CD33 K562细胞裂解,而LTG1906在x轴上列出的效应物与靶标(E:T)比下显示出优异的细胞裂解功能(参见图4,LTG1905和LTG1906,分别为黑色菱形和圆形)。当与高CD33HL-60肿瘤细胞系结合使用时,LTG1906而不是LTG1905显示出有效的杀伤功能,突出了构建体LTG1906的稳健性。相比之下,阴性对照组NT(未经转导的T细胞)和1398(通过GFP对照转导的T细胞)中的任一个没有发挥出特异性细胞裂解活性,因此,我们观察到的抗CD33 CAR LTG1906和LTG1905对表达CD33的肿瘤细胞系的细胞裂解活性既是靶特异性的也是CART依赖性的。

[0146] 相比之下,基于ScFv的抗CD33 CAR构建体LTG1936和LTG1939能够有效地裂解高CD33肿瘤细胞系HL-60和MOLM-14,而它们仅部分裂解低CD33 Reh肿瘤细胞系,并且对K562没有比裂解活性(参见图7,LTG1398和LTG1936,分别为白色正方形和白色倒三角形)。该发现证明了所产生的CAR构建体的效率和特异性。出乎意料的是,在该组中测试的其他CAR构建体LTG1937和LTG1938在裂解高CD33肿瘤细胞系时是低效的,因此再次证明CART设计并非无关紧要,并且可溶性抗体特征不能直接转化为CAR功能。

[0147] 然后评估了抗CD33 CAR T细胞的细胞因子分泌能力。将肿瘤细胞与CAR T细胞或对照T细胞以10:1的效应物与靶标的比共孵育过夜,并且通过ELISA分析培养上清液中的IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 和IL-2(参见图5和表2)。值得注意的是,CAR T表达细胞LTG1905和LTG1906产生高水平的IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 和IL-2,而阴性对照NT和1398组未产生可察觉的细胞因子诱导。出乎意料地,与构建体LTG1906相比,CD33 CAR LTG1905倾向于产生更高水平的针对所有测试的肿瘤细胞系的诱导的细胞因子。该结果与LTG1905相比于LTG1906更低的体外细胞裂解功能(参见图4)相反,表明需要在逐个构建体的基础上测试多个CAR T功能终点。

[0148] 不期望限于任何特定作用机理,认为与本发明的示例性CAR相关的治疗功能增强的可能原因包括例如但不限于:a)在质膜内的横向运动改善,从而允许更有效的信号转导;b)在质膜微结构域(例如脂筏)内的优异定位,以及与和T细胞活化相关的跨膜信号转导级联相互作用的能力更大;c)通过优先移动远离抑制性或下调性相互作用(例如与磷酸酶例如CD45的接近性或相互作用较低)而在质膜内优异定位;以及d)优异组装成T细胞受体信号转导复合物(即免疫突触);或其任意组合。

[0149] 尽管已经用示例性的细胞外CD33仅可变重链和ScFv抗原结合结构域说明了本公开内容,但是CD33仅可变重链和ScFv抗原结合结构域内的其他核苷酸和/或氨基酸变体可以用于推导用于本文所述的CAR中的CD33抗原结合结构域。

[0150] 根据待靶向的期望抗原,CAR可以被另外改造成包含对期望抗原靶标具有特异性的合适抗原结合结构域。例如,如果CD19是待靶向的期望抗原,则可以使用针对CD19的抗体作为抗原结合结构域并入CAR中。

[0151] 在一个示例性实施方案中, CAR的抗原结合结构域部分还靶向CD19。优选地, CAR中的抗原结合结构域是抗CD19 ScFV, 其中抗CD19 ScFV的核酸序列包含SEQ ID NO:37所示的序列。在一个实施方案中, 抗CD19 ScFV包含编码SEQ ID NO:30的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中, CAR的抗CD19 ScFV部分包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。

[0152] 在本发明的一方面, 提供了能够与非TSA或非TAA结合的CAR, 所述非TSA或非TAA包括例如但不限于来源于以下的抗原: 逆转录病毒科 (例如人免疫缺陷病毒, 例如HIV-1和HIV-LP)、小核糖核酸病毒科 (例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒和艾柯病毒)、风疹病毒、冠状病毒、水疱性口炎病毒、狂犬病病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒、流感病毒、乙型肝炎病毒、细小病毒、腺病毒科、疱疹病毒科 [例如1型和2型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV)、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 和疱疹病毒]、痘病毒科 (例如天花病毒、痘苗病毒和痘病毒) 或丙型肝炎病毒, 或其任意组合。

[0153] 在本发明的另一方面, 提供了能够与来源于以下细菌菌株的抗原结合的CAR: 葡萄球菌属 (Staphylococci)、链球菌属 (Streptococcus)、大肠杆菌 (Escherichia coli)、假单胞菌属 (Pseudomonas) 或沙门氏菌属 (Salmonella)。特别地, 提供了能够与来源于例如以下的感染性细菌的抗原结合的CAR: 幽门螺杆菌 (Helicobacter pyloris)、嗜肺军团菌 (Legionella pneumophila)、分枝杆菌属 (Mycobacteria sp.) 的细菌菌株 (例如结核分枝杆菌 (M. tuberculosis)、鸟分枝杆菌 (M. avium)、胞内分枝杆菌 (M. intracellulare)、堪萨斯分枝杆菌 (M. kansasii) 或戈登分枝杆菌 (M. goodii))、金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、淋病奈瑟氏球菌 (Neisseria gonorrhoeae)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (Neisseria meningitidis)、单核细胞增生李斯特氏菌 (Listeria monocytogenes)、酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)、A类链球菌 (Group A Streptococcus)、B类链球菌 (Group B Streptococcus) (无乳链球菌 (Streptococcus agalactiae))、肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae) 或破伤风梭菌 (Clostridium tetani), 或其组合。

## [0154] 2. 跨膜结构域

[0155] 关于跨膜结构域, CAR包含一个或更多个与CAR的细胞外CD33抗原结合结构域融合的跨膜结构域。

[0156] 跨膜结构域可以来源于天然来源或合成来源。如果来源是天然的, 则结构域可来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。

[0157] 在本文所述的CAR中特别使用的跨膜区可来源于以下 (即包含至少以下的跨膜区): T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、间皮素、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。或者, 跨膜结构域可以是合成的, 在这种情况下其将主要包含疏水性残基例如亮氨酸和缬氨酸。优选地, 苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体将存在于合成跨膜结构域的每个末端。任选地, 短的寡肽接头或多肽接头 (优选地长度为2至10个氨基酸) 可以在CAR的跨膜结构域和胞质信号转导结构域之间形成连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供特别合适的接头。

[0158] 在一个实施方案中, 除了上文所述的跨膜结构域之外, 还使用天然与CAR中结构域之一缔合的跨膜结构域。

[0159] 在一些情况下, 可以通过氨基酸替换对跨膜结构域进行选择以避免这样的结构域

与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合从而使与受体复合物中其他成员的相互作用最小化。

[0160] 在一个实施方案中,本发明CAR中的跨膜结构域是CD8跨膜结构域。在一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:27的核酸序列。在一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:28的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0161] 在一个实施方案中,编码的跨膜结构域包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,替换)但不超过20、10或5个修饰(例如,替换)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有95至99%同一性的序列。

[0162] 在一些情况下,CAR的跨膜结构域包含CD8 $\alpha$ 铰链结构域。在一个实施方案中,CD8铰链结构域包含SEQ ID NO:29的核酸序列。在一个实施方案中,CD8铰链结构域包含编码SEQ ID NO:30的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8铰链结构域包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,或与其具有95至99%的同一性的序列。

[0163] 在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的接头结构域来源于CD8的细胞外结构域,并与跨膜CD8结构域、跨膜CD28结构域或其组合连接。

[0164] 在一个实施方案中,本发明CAR中的跨膜结构域是TNFRSF19跨膜结构域。在一个实施方案中,TNFRSF19跨膜结构域包含SEQ ID NO:51的核酸序列。在一个实施方案中,TNFRSF19跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:52的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,TNFRSF19跨膜结构域包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0165] 在一个实施方案中,所编码的跨膜结构域包含具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,替换)但不超过20、10或5个修饰(例如,替换)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有95至99%同一性的序列。

[0166] 3.间隔区结构域

[0167] 在CAR中,间隔区结构域(也称为铰链结构域)可以布置在细胞外结构域和跨膜结构域之间,或布置在细胞内结构域和跨膜结构域之间。间隔区结构域意指用于连接跨膜结构域与细胞外结构域和/或跨膜结构域与细胞内结构域的任何寡肽或多肽。间隔区结构域包含多至300个氨基酸,优选10至100个氨基酸,并且最优选25至50个氨基酸。

[0168] 在一些实施方案中,接头可以包含间隔区元件,其当存在时增加接头的尺寸使得效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段之间的距离增加。示例性的间隔区是普通技术人员已知的,并且包括以下中列举的那些:美国专利No.7,964,566/7,498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414,以及美国专利公开No.20110212088和20110070248,其各自通过引用整体并入本文。

[0169] 间隔区结构域优选地具有促进CAR与抗原结合并增强信号转导到细胞内的序列。预期促进结合的氨基酸的一些实例包括半胱氨酸、带电荷氨基酸以及在潜在糖基化位点中的丝氨酸和苏氨酸,并且这些氨基酸可以被用作构成间隔区结构域的氨基酸。

[0170] 作为间隔区结构域,可以使用为CD8 $\alpha$ 之铰链区的第118至178号氨基酸(SEQ ID NO:31)(NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)、CD8 $\beta$ 的第135至195号氨基酸(GenBank:

AAA35664.1)、CD4的第315至396号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--000607.1)或CD28的第137至152号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--006130.1)的全部或部分。另外,作为间隔区结构域,可以使用抗体H链或L链的恒定区的一部分(CH1区或CL区,例如具有SEQ ID NO.:32中所示的氨基酸序列的肽)。另外,间隔区结构域可以是人工合成序列。

[0171] 另外,可以使用人IgG4(UniProt ID:P01861)的恒定区的氨基酸的全部或部分,其包含CH1(第1至98号氨基酸)、铰链(SEQ ID NO:80,和相应核苷酸SEQ ID NO:79)(第99至110号氨基酸)、CH2(氨基酸SEQ ID NO:81和相应核苷酸SEQ ID NO:80)(第111至220号氨基酸)、和CH3(SEQ ID NO:84,和相应核苷酸SEQ ID NO:83)(第221至327号氨基酸)或其组合,例如IgG4铰链CH2 CH3结构域(SEQ ID NO:86和相应的核苷酸SEQ ID NO:85)。

[0172] 在一个实施方案中,CAR的间隔区结构域包含TNFRSF19铰链结构域,其包含SEQ ID NO:53的核酸序列。在一个实施方案中,TNFRSF19铰链结构域包含编码SEQ ID NO:54的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,TNFRSF19铰链结构域包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列或与其具有95至99%同一性的序列。

[0173] 在一个实施方案中,CAR的间隔区结构域包含TNFRSF19截短的铰链结构域,其包含SEQ ID NO:55的核酸序列。在一个实施方案中,TNFRSF19截短的铰链结构域包含编码SEQ ID NO:56的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,TNFRSF19截短的铰链结构域包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列或与其具有95至99%同一性的序列。

[0174] 在一个实施方案中,TNFRSF19铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:49的核酸序列。在一个实施方案中,TNFRSF19铰链和跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:50的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,TNFRSF19铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,或与其具有95至99%同一性的序列。

[0175] 在一个实施方案中,CD8a铰链结构域与TNFRSF19跨膜结构域融合,其包含SEQ ID NO:57的核酸序列。在一个实施方案中,CD8a铰链结构域与TNFRSF19跨膜结构域融合,其包含编码SEQ ID NO:58的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8a铰链结构域与TNFRSF19跨膜结构域融合,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列,或与其具有95至99%同一性的序列。

[0176] 另外,在CAR中,信号肽序列(也称为前导肽)可以与N端连接。信号肽序列存在于许多分泌蛋白和膜蛋白的N端,并且长度为15至30个氨基酸。由于上文作为细胞内结构域提及的很多蛋白质分子都具有信号肽序列,因此这些信号肽可以用作CAR的信号肽。在一个实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0177] 在一个实施方案中,CD8a前导肽包含SEQ ID NO:43的核酸序列。在一个实施方案中,CD8a前导肽包含编码SEQ ID NO:44的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8a铰链结构域与包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列或与其具有95至99%同一性的序列的TNFRSF19跨膜结构域融合。

[0178] 在另一个实施方案中,GMCSF前导肽包含SEQ ID NO:39的核酸序列。在一个实施方案中,GMCSF前导肽包含编码SEQ ID NO:40的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8a铰链结构域与包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列或与其具有95至99%同一性的序列的TNFRSF19跨膜结构域融合。

[0179] 在另一个实施方案中,TNFRSF19前导肽包含SEQ ID NO:41的核酸序列。在一个实

施方案中, TNFRSF19前导肽和CD8 $\alpha$ 前导肽包含编码SEQ ID NO:42的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中, CD8 $\alpha$ 铰链结构域与包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列或与其具有95至99%同一性的序列的TNFRSF19跨膜结构域融合。

[0180] 在一个实施方案中, 编码表皮生长因子受体的截短序列(tEGFR)的标签序列包含SEQ ID NO:67的核酸序列。在一个实施方案中, tEGFR包含编码SEQ ID NO:68的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中, tEGFR标签包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列, 或与其具有95至99%同一性的序列。

[0181] 在一个实施方案中, 设计用于标签序列和CAR序列的同时双顺反子表达的弗林蛋白酶识别位点和下游T2A自切割肽序列包含SEQ ID NO:65的核酸序列。在一个实施方案中, 弗林蛋白酶和T2A序列包含编码SEQ ID NO:66的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中, tEGFR标签包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列或与其具有95至99%同一性的序列。

[0182] 在一个实施方案中, 设计用于标签序列和CAR序列的同时双顺反子表达的上游弗林蛋白酶识别位点和T2A自切割肽序列以及弗林蛋白酶识别下游位点包含SEQ ID NO:67的核酸序列。在一个实施方案中, 弗林蛋白酶和T2A序列包含编码SEQ ID NO:68的氨基酸序列的核酸序列。在另一实施方案中, tEGFR标签包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列或与其具有95至99%同一性的序列。

[0183] 在一个实施方案中, CAR的靶向结构域以单克隆抗体、ScFv Fab、Fab'2的形式单独表达, 并且包含在结合标签或表位, 而CAR的效应细胞表达的组分包含特异性针对以结合可溶性CAR模块上表达的标签或表位的结合结构域, 例如CAR的可溶性组分与细胞结合组分的特异性结合形成完整的功能CAR结构。

#### [0184] 4. 细胞内结构域

[0185] CAR的胞质结构域或另外的细胞内信号转导结构域负责激活其中已放置CAR的免疫细胞的至少一种正常效应功能。术语“效应功能”是指细胞的特化功能。例如, T细胞的效应功能可以是细胞裂解活性或辅助活性, 包括分泌细胞因子。因此, 术语“细胞内信号转导结构域”是指转导效应功能信号并指导细胞进行特化功能的蛋白质部分。虽然通常可以使用整个细胞内信号转导结构域, 但是在许多情况下不需要使用整个链。就使用细胞内信号转导结构域的截短部分来说, 这样的截短部分可以用于代替完整链, 只要其转导效应功能信号即可。术语细胞内信号转导结构域因此意味着包括细胞内信号转导结构域的足以转导效应功能信号的任何截短部分。

[0186] 用于CAR的细胞内信号转导结构域的一些优选实例包括T细胞受体(TCR)和协同作用以在抗原受体衔接后起始信号转导的共受体的胞质序列, 以及具有相同功能能力的这些序列的任何衍生物或变体和任何合成序列。

[0187] 已知通过单独TCR产生的信号不足以完全活化T细胞并且还需要次级或共刺激信号。因此, T细胞活化可以被认为由两种不同种类的胞质信号转导序列介导: 通过TCR起始抗原依赖性初级活化的那些(初级胞质信号转导序列)和以抗原独立性方式作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号转导序列)。

[0188] 初级胞质信号转导序列以刺激性方式或以抑制性方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激性方式起作用的初级胞质信号转导序列可以包含称为免疫受体酪氨酸基活化基序或ITAM的信号转导基序。

[0189] 特别用于本文所公开CAR的包含ITAM的初级胞质信号转导序列的一些实例包括来源于TCR $\zeta$  (CD3 $\zeta$ )、FcR $\zeta$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。ITAM的具体非限制性实例包括具有以下序列的肽:CD3 $\zeta$ 的第51至164号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--932170.1)、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 的第45至86号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--004097.1)、Fc $\epsilon$ RI $\beta$ 的第201至244号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--000130.1)、CD3 $\gamma$ 的第139至182号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--000064.1)、CD3 $\delta$ 的第128至171号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--000723.1)、CD3 $\epsilon$ 的第153至207号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--000724.1)、CD5的第402至495号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--055022.2)、0022的第707至847号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--001762.2)、CD79a的第166至226号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--001774.1)、CD79b的第182至229号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--000617.1)和CD66d的第177至252号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--001806.2),以及其与这些肽具有相同功能的变体。本文所述的基于NCBI RefSeq ID或GenBank的氨基酸序列信息的氨基酸编号是基于每种蛋白质的前体(包含信号肽序列等)的全长进行编号的。在一个实施方案中,CAR中的胞质信号转导分子包含来源于CD3 $\zeta$ 的胞质信号转导序列。

[0190] 在一个优选实施方案中,CAR的细胞内结构域可以被设计成包含单独或与任何其他可用于CAR背景的期望胞质结构域组合的CD3- $\zeta$ 信号转导结构域。例如,CAR的细胞内结构域可以包含CD3 $\zeta$ 链部分和共刺激信号转导区。共刺激信号转导区是指CAR中包含共刺激分子的细胞内结构域的部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效响应所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。这样的共刺激分子的一些实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。这样的共刺激分子的具体非限制性实例包括具有以下序列的肽:CD2的第236至351号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--001758.2)、CD4的第421至458号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--000607.1)、CD5的第402至495号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--055022.2)、CD8 $\alpha$ 的第207至235号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)、CD83的第196至210号氨基酸 (GenBank:AAA35664.1)、CD28的第181至220号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--006130.1)、CD137的第214至255号氨基酸 (4-1BB, NCBI RefSeq:NP.sub.--001552.2)、CD134的第241至277号氨基酸 (OX40, NCBI RefSeq:NP.sub.--003318.1)和ICOS的第166至199号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--036224.1),以及其与这些肽具有相同功能的变体。因此,尽管本文的公开内容主要用4-1BB作为共刺激信号转导元件来举例说明,但是其他共刺激元件也在本公开内容的范围内。

[0191] CAR的胞质信号转导部分内的胞质信号转导序列可以以随机或特定顺序彼此连接。任选地,短的寡肽接头或多肽接头(优选地长度为2至10个氨基酸)可以形成连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供特别合适的接头。

[0192] 在一个实施方案中,细胞内结构域被设计成包含CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域和CD28的信号转导结构域。在另一个实施方案中,细胞内结构域被设计成包含CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域和4-1BB的信号转导结构域。在另一个实施方案中,细胞内结构域被设计成包含CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域以及CD28和4-1BB的信号转导结构域。

[0193] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号转导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域,其中4-1BB的信号转导结构域包含分别在SEQ ID NO:33、SEQ

ID NO:45或SEQ ID NO:59中所示的核酸序列,并且CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域包含分别在SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:61中所示的核酸序列。

[0194] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号转导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域,其中4-1BB的信号转导结构域包含分别编码SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:60的氨基酸序列的核酸序列,并且CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域包含编码SEQ ID NO:36、或SEQ ID NO:48、或SEQ ID NO:62的氨基酸序列的核酸序列。

[0195] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号转导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域,其中4-1BB的信号转导结构域包含分别在SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:60中所示的氨基酸序列,并且CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域包含分别在SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列。

[0196] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含CD28的信号转导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域,其中CD28的信号转导结构域包含分别在SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:59中所示的核酸序列,并且CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域包含分别在SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:61中所示的核酸序列。

[0197] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含CD28的信号转导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域,其中CD28的信号转导结构域包含分别编码SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:60的氨基酸序列的核酸序列,并且CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域包含编码SEQ ID NO:36、或SEQ ID NO:48、或SEQ ID NO:62的氨基酸序列的核酸序列。

[0198] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含CD28的信号转导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域,其中CD28的信号转导结构域包含分别在SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:60中所示的氨基酸序列,并且CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域包含分别在SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列。

[0199] 5.CAR的附加描述

[0200] 还明确地包括在本发明的范围内的是本文所公开的CAR的功能性部分。当参考CAR使用时,术语“功能性部分”是指本文所公开的一种或更多种CAR的以下任何部分或片段,所述部分或片段保留CAR(所述部分或片段为其一部分)(亲本CAR)的生物活性。功能性部分涵盖例如CAR的以下那些部分,其与亲本CAR相比在类似程度上、在相同程度上或在更高程度上保留识别靶细胞或者检测、治疗或预防疾病的能力。参考亲本CAR,功能性部分可以包含例如亲本CAR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0201] 功能性部分可以在该部分的氨基或羧基末端或在两端包含另外的氨基酸,所述另外的氨基酸在亲本CAR的氨基酸序列中不存在。期望地,另外的氨基酸不干扰功能性部分的生物功能,例如识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更期望地,与亲本CAR的生物活性相比,另外的氨基酸增强生物活性。

[0202] 包括在本公开内容的范围内的是本文所公开CAR的功能性变体。本文所用的术语“功能性变体”是指与亲本CAR具有明显或显著序列同一性或相似性的CAR、多肽或蛋白质,所述功能性变体保留CAR(所述功能性变体为其变体)的生物活性。功能性变体涵盖例如本文所述CAR(亲本CAR)的以下那些变体,其与亲本CAR相比在类似程度上、在相同程度上或在更高程度上保留识别靶细胞的能力。参考亲本CAR,功能性变体可以例如与亲本CAR在氨基酸序列方面具有至少约30%、50%、75%、80%、90%、98%或更高同一性。



[0203] 功能性变体可以例如包含具有至少一个保守性氨基酸替换的亲本CAR的氨基酸序列。作为替代或补充,功能性变体可以包含具有至少一个非保守性氨基酸替换的亲本CAR的氨基酸序列。在这种情况下,非保守性氨基酸替换优选地不干扰或抑制功能性变体的生物活性。非保守性氨基酸替换可以增强功能性变体的生物活性,使得与亲本CAR相比,功能性变体的生物活性提高。

[0204] CAR的氨基酸替换优选地是保守性氨基酸替换。保守性氨基酸替换是本领域已知的,并且包括其中将一个具有特定物理和/或化学特性的氨基酸交换为另一个具有相同或相似化学或物理特性的氨基酸的氨基酸替换。例如,保守性氨基酸替换可以是酸性/带负电荷的极性氨基酸替换另一个酸性/带负电荷的极性氨基酸(例如,Asp或Glu)、具有非极性侧链的氨基酸替换另一个具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、He、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)、碱性/带正电荷的极性氨基酸替换另一个碱性/带正电荷的极性氨基酸(例如,Lys、His、Arg等)、具有极性侧链的不带电荷氨基酸替换另一个具有极性侧链的不带电荷的氨基酸(例如,Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等)、具有 $\beta$ 支化侧链的氨基酸替换另一个具有 $\beta$ 支化侧链的氨基酸(例如He、Thr和Val)、具有芳香族侧链的氨基酸替换另一个具有芳香族侧链的氨基酸(例如His、Phe、Trp和Tyr),等。

[0205] CAR可以基本上由本文所述的一个或更多个特定氨基酸序列组成,使得其他组分(例如,其他氨基酸)不会实质上改变功能性变体的生物活性。

[0206] CAR(包括功能性部分和功能性变体)可以具有任意长度,即可以包含任意数目的氨基酸,只要CAR(或其功能性部分或功能性变体)保留其生物活性,例如与抗原特异性结合、在哺乳动物中检测患病细胞或在哺乳动物中治疗或预防疾病等的能力即可。例如,CAR可以为约50至约5000个氨基酸长,例如长度为50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个氨基酸。

[0207] CAR(包括本发明的功能性部分和功能性变体)可以包含取代一个或更多个天然存在氨基酸的合成氨基酸。这样的合成氨基酸是本领域已知的,并且包括例如氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、-氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-羟脯氨酸和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 $\beta$ -苯基丝氨酸、 $\beta$ -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 $\alpha$ -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸一酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟赖氨酸、鸟氨酸、-氨基环戊烷羧酸、 $\alpha$ -氨基环己烷羧酸、 $\alpha$ -氨基环庚烷羧酸、 $\alpha$ -(2-氨基-2-降冰片烷)-羧酸、 $\gamma$ -二氨基丁酸、 $\beta$ -二氨基丙氨酸、高苯丙氨酸和 $\alpha$ -叔丁基甘氨酸。

[0208] CAR(包括功能性部分和功能性变体)可以被糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、环化(通过例如二硫桥)或转化成酸加成盐和/或任选地二聚或多聚的,或缀合的。

[0209] CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可以通过本领域已知的方法获得。CAR可以通过任何制备多肽或蛋白质的合适方法来制备。从头合成多肽和蛋白质的合适方法在例如以下的参考文献中描述:Chan等,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2000;Peptide and Protein Drug Analysis,编辑.Reid,R.,Marcel Dekker,Inc.,2000;Epitope Mapping,编辑.Westwood等,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2001;以及美国专利5,449,752。

另外,可以使用本文所述的核酸使用标准重组方法重组产生多肽和蛋白质。参见例如 Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第三版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY 2001;和Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994。另外,一些CAR (包括其功能性部分和功能性变体)可以从例如植物、细菌、昆虫、哺乳动物(如,大鼠、人等)的来源分离和/或纯化。分离和纯化的方法是本领域公知的。或者,本文所述的CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可以由公司商业化合成。在这方面,CAR可以是合成的、重组的、分离的和/或经纯化的。

#### [0210] B. 抗体和抗原结合片段

[0211] 一个实施方案还提供了与本文所公开的一种或更多种抗原特异性结合的CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合结构域或部分。本文所用的“表达CAR的T细胞”或“CAR T细胞”意指表达CAR的T细胞,并且具有由例如CAR的抗体来源靶向结构域决定的抗原特异性。

[0212] 本文所用的“抗原结合结构域”可以包括抗体及其抗原结合片段。术语“抗体”在本文以最广义含义使用并且涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体),及其抗原结合片段,只要其展现出所期望的抗原结合活性即可。抗体的非限制性实例包括例如完整的免疫球蛋白及其本领域已知的保留对抗原的结合亲和力的变体和片段。

[0213] “单克隆抗体”是从基本上均一的抗体的群中获得的抗体,即除可能少量存在的可能天然存在突变之外,构成该群的单独抗体是相同的。单克隆抗体是高特异性的,定向针对单一抗原表位。修饰语“单克隆的”表示抗体从基本上均一的抗体群获得的特征,并且不被解释为要求通过任何特定方法产生抗体。在一些实例中,单克隆抗体是由B淋巴细胞的单克隆或由其中已转染编码单一抗体的抗体轻链可变区和重链可变区(或其抗原结合片段)的核酸的细胞或其子代产生的抗体。在一些实例中,单克隆抗体从对象分离。单克隆抗体可以具有基本上对抗原结合或其他免疫球蛋白功能没有影响的保守性氨基酸替换。产生单克隆抗体的示例性方法是已知的,例如参见Harlow&Lane,Antibodies,A Laboratory Manual,第二版.Cold Spring Harbor Publications,New York(2013)。

[0214] 通常,免疫球蛋白具有通过二硫键互相连接的重(H)链和轻(L)链。免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 和 $\mu$ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变结构域基因。存在两种轻链类型: $\lambda$ 和 $\kappa$ 。存在五种主要的决定抗体分子的功能活性的重链种类(或同种型):IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0215] 每条重链和轻链都包含恒定区(或恒定结构域)和可变区(或可变结构域;参见例如Kindt等,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。)。在一些实施方案中,重链和轻链可变区组合以与抗原特异性结合。在另一些实施方案中,仅需要重链可变区。例如,由仅重链组成的天然存在骆驼科抗体在不存在轻链的情况下具有功能性且稳定(参见例如Hamers-Casterman等,Nature,363:446-448,1993;Sheriff等,Nat.Struct.Biol.,3:733-736,1996)。对“VH”的提及或“VH”是指抗体重链的可变区,包括例如Fv、ScFv、dsFv或Fab的抗原结合片段的可变区。对“VL”的提及或“VL”是指抗体轻链的可变结构域,包括Fv、ScFv、dsFv或Fab的可变结构域。

[0216] 轻链和重链可变区包含被三个还称作“互补性决定区”或“CDR”的高变区中断的“框架”区(参见例如Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S.Department of Health and Human Services,1991)。不同轻链或重链的框架区的序列在物种内相对保守。抗体的框架区(即组成轻链和重链的组合框架区)用于在三维空间中定位和排列CDR。

[0217] CDR主要负责与抗原表位的结合。给定CDR的氨基酸序列边界可以使用许多公知方案中的任一种来容易地确定,所述方案包括由以下描述的那些:Kabat等(“*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,”第五版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991;“Kabat”编号方案)、Al-Lazikani等(JMB 273, 927-948,1997;“Chothia”编号方案)和Lefranc等(“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”*Dev.Comp.Immunol.*,27:55-77,2003;“IMGT”编号方案)。每条链的CDR通常是指CDR1、CDR2和CDR3(从N端到C端),并且还通常由特定CDR所在的链鉴定。因此,VH CDR3是来自发现其的抗体的重链可变结构域的CDR3,而VL CDR1是来自发现其的抗体的轻链可变结构域的CDR1。轻链CDR有时被称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。重链CDR有时被称为HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0218] “抗原结合片段”是全长抗体中保留特异性识别同源抗原的能力的部分,以及这样的部分的多种组合。抗原结合片段的非限制性实例包括Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如ScFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段包括通过整个抗体的修饰产生的抗原结合片段或使用重组DNA方法从头合成的那些(参见例如Kontermann和Dubel(编辑),*Antibody Engineering*,第1至2卷,第二版,Springer Press,2010)。

[0219] 单链抗体(ScFv)是包含通过合适多肽接头连接为遗传融合单链分子的一种或更多种抗体的VH和VL结构域的经遗传改造分子(参见例如Bird等,*Science*,242:423-426,1988;Huston等,*Proc.Natl.Acad.Sci.*,85:5879-5883,1988;Ahmad等,*Clin.Dev.Immunol.*,2012,doi:10.1155/2012/980250;Marbry,*IDrugs*,13:543-549,2010)。ScFv中VH结构域和VL结构域的分子内定向对于ScFv通常不是决定性的。因此,可以使用具有两种可能布置的ScFv(VH结构域-接头结构域-VL结构域;VL结构域-接头结构域-VH结构域)。

[0220] 在dsFv中,重链和轻链可变链已经被突变以引入二硫键从而使链的缔合稳定。还包括双抗体,其是以下二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用太短以致不能允许在同一链上的两个结构域之间进行配对的接头,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger等,*Proc.Natl.Acad.Sci.*,90:6444-6448,1993;Poljak等,*Structure*,2:1121-1123,1994)。

[0221] 抗体还包括经遗传改造形式例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)和异缀合抗体(例如双特异性抗体)。还参见Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL);Kuby,J.,*Immunology*,第三版,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。

[0222] 非天然存在抗体可以使用固相肽合成来构建,可以重组产生,或者可以例如通过筛选由可变重链和可变轻链组成的组合文库来获得,如Huse等,*Science* 246:1275-1281

(1989)所述,其通过引用并入本文。这些和其他制备例如嵌合抗体、人源化抗体、CDR接枝抗体、单链抗体和双功能性抗体的方法是本领域技术人员公知的(Winter和Harris, Immunol.Today 14:243-246(1993);Ward等,Nature 341:544-546(1989);Harlow和Lane,同上,1988;Hilyard等,Protein Engineering:A practical approach(IRL Press 1992);Borrabeck,Antibody Engineering,第二版.(Oxford University Press 1995);其各自通过引用并入本文)。

[0223] 与参考抗体“结合相同表位的抗体”是指在竞争测定中使参考抗体与其抗原的结合阻断50%或更多的抗体,反之亦然,参考抗体在竞争测定中使该抗体与其抗原的结合阻断50%或更多。抗体竞争测定是已知的,并且本文提供了示例性的竞争测定。

[0224] “人源化”抗体或抗原结合片段包含人框架区和来自非人(例如小鼠、大鼠或合成的)抗体或抗原结合片段的一个或更多个CDR。提供CDR的非人抗体或抗原结合片段被称作“供体”,并且提供框架的人抗体或抗原结合片段被称作“接受者”。在一个实施方案中,在人源化免疫球蛋白中所有CDR都来自供体免疫球蛋白。恒定区不需要存在,但如果其存在的话,其可以基本上与人免疫球蛋白恒定区相同,例如同源性为至少约85%至90%,例如约95%或更高。因此,人源化抗体或抗原结合片段的所有部分(除可能地CDR之外)都基本上与天然人抗体序列的对应部分相同。

[0225] “嵌合抗体”是包含来源于两种不同抗体的序列的抗体,所述两种不同抗体通常是不同物种的。在一些实例中,嵌合抗体包含一个或更多个来自一种人抗体的CDR和/或框架区和来自另一种人抗体的CDR和/或框架区。

[0226] “完全人抗体”或“人抗体”是包含来自(或来源于)人基因组的序列,并且不包含来自另一物种的序列的抗体。在一些实施方案中,人抗体包含来自(或来源于)人基因组的CDR、框架区、和(如果存在的话)Fc区。人抗体可以使用基于来源于人基因组的序列产生抗体的技术,例如通过噬菌体展示或使用转基因动物来鉴定和分离(参见例如Barbas等, Phage display:A Laboratory Manuel.第一版New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,2004.印刷;Lonberg,Nat.Biotech.,23:1117-1125,2005;Lonenberg, Curr.Opin.Immunol.,20:450-459,2008)。

[0227] 抗体可以具有一个或更多个结合位点。如果存在多于一个结合位点,则结合位点可以彼此相同或可以是不同的。例如,天然存在的免疫球蛋白具有两个相同的结合位点,单链抗体或Fab片段具有一个结合位点,而双特异性或双功能性抗体具有两个不同的结合位点。

[0228] 测试抗体与CAR的任何功能性部分结合的能力的方法是本领域已知的并且包括任何抗体-抗原结合测定,例如如放射免疫测定(radioimmunoassay,RIA)、ELISA、Western印迹、免疫沉淀和竞争性抑制测定(参见例如,Janeway等,同下,美国专利申请出版物No.2002/0197266 A1和美国专利No.7,338,929)。

[0229] 另外,CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分可以被修饰以包含可检测标记,例如如放射性同位素、荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE))、酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(例如,金颗粒)。

[0230] C.缀合物

[0231] 对本文所公开的一种或更多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞或单克隆

抗体或其抗原结合片段可以使用本领域技术人员已知的任意数量方法与例如效应分子或可检测标志物的试剂缀合。共价和非共价连接方法二者都可以使用。缀合物包括但不限于其中效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段共价连接的分子,所述抗体或抗原结合片段与本文所公开的一种或更多种抗原特异性结合。本领域技术人员将理解可以使用多种效应分子和可检测标志物,包括(但不限于)化学治疗剂、抗血管生成剂、毒素、放射性试剂(例如 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 和 $^{35}\text{S}$ )以及其他标记、靶部分和配体等。

[0232] 特定效应分子或可检测标志物的选择取决于特定靶分子或细胞,以及期望的生物作用。因此,例如效应分子可以是用于致使特定靶细胞(例如肿瘤细胞)死亡的细胞毒素。

[0233] 用于使效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段连接的操作根据效应物的化学结构而改变。多肽通常包含多种可用于与抗体上的合适官能团反应以使效应分子或可检测标志物结合的官能团,例如羧酸基团( $\text{COOH}$ )、游离胺基( $-\text{NH}_2$ )或巯基( $-\text{SH}$ )。或者,抗体或抗原结合片段是衍生化的以暴露或连接另外的反应性官能团。衍生化可以涉及连接多种已知接头分子例如可从Pierce Chemical Company, Rockford, IL获得的那些中的任一种。接头可以是用于将抗体或抗原结合片段与效应分子或可检测标志物连接的任何分子。接头能够与抗体或抗原结合片段并且与效应分子或可检测标志物形成共价键。合适的接头是本领域技术人员公知的并且包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头或肽接头。当抗体或抗原结合片段和效应分子或可检测标志物是多肽时,接头可以通过其侧基(例如通过与半胱氨酸的二硫键)与组成氨基酸连接或者与末端氨基酸的 $\alpha$ 碳氨基和羧基基团连接。

[0234] 在数个实施方案中,接头可以包含间隔区元件,其当存在时增加接头的尺寸使得效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段之间的距离增加。示例性的间隔区是普通技术人员已知的,并且包括以下中列举的那些:美国专利No. 7,964,566/7,498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414,以及美国专利公开No. 20110212088和20110070248,其各自通过引用整体并入本文。

[0235] 在一些实施方案中,接头在细胞内条件下是可切割的,使得在细胞内环境中接头的切割从抗体或抗原结合片段释放效应分子或可检测标志物。在另一些实施方案中,接头是不可切割的并且效应分子或可检测标志物例如通过抗体降解来释放。在一些实施方案中,接头可被存在于细胞内环境(例如在溶酶体或内体或小窝(caveolea)内)的切割剂切割。接头可以是例如被细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶)切割的肽接头。在一些实施方案中,肽接头为至少2个氨基酸长或至少3个氨基酸长。然而,接头可以为4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸长,例如1至2、1至3、2至5、3至10、3至15、1至5、1至10、1至15个氨基酸长。蛋白酶可以包括组织蛋白酶B和组织蛋白酶D以及纤溶酶,已知其所有都水解二肽药物衍生物使得活性药物在靶细胞内释放(参见例如Dubowchik和Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123)。例如,可以使用可被巯基依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B切割的肽接头(例如苯丙氨酸-亮氨酸或甘氨酸-苯丙氨酸-亮氨酸-甘氨酸接头)。这样的接头的另一些实例在例如美国专利No. 6,214,345中描述,其通过引用并入本文。在一个具体实施方案中,可被细胞内蛋白酶切割的肽接头是缬氨酸-瓜氨酸接头或苯丙氨酸-赖氨酸接头(参见例如美国专利No. 6,214,345,其描述了使用缬氨酸-瓜氨酸接头的

多柔比星合成)。

[0236] 在另一些实施方案中,可切割接头是pH敏感性的,即在特定pH值下对水解敏感。通常,pH敏感性接头在酸性条件下是可水解的。例如,可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定性接头(例如脲、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见例如美国专利No.5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics 83:67-123;Neville等,1989,Biol.Chem.264:14653-14661。)这样的接头在中性pH条件(例如血液中的那些)下是相对稳定的,但在低于pH 5.5或pH 5.0(溶酶体的近似pH)下不稳定。在某些实施方案中,可水解的接头是硫醚接头(例如如经由酰脲键与治疗剂连接的硫醚)(参见例如美国专利No.5,622,929)。

[0237] 在另一些实施方案中,接头在还原条件下是可切割的(例如二硫化物接头)。各种二硫化物接头是本领域已知的,其包括例如可以使用以下形成的那些:SATA(N-琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺-氧基羰基- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)-、SPDB和SMPT。(参见例如Thorpe等,1987,Cancer Res.47:5924-5931;Wawrzynczak等,In Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer(C.W.Vogel编辑,Oxford U.Press,1987);Phillips等,Cancer Res.68:92809290,2008)。还参见美国专利No.4,880,935)。

[0238] 在另一些具体实施方案中,接头是丙二酸酯接头(Johnson等,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺基苯甲酰基接头(Lau等,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304)或3'-N-酰胺类似物(Lau等,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。

[0239] 在另一些实施方案中,接头是不可切割的并且效应分子或可检测标志物通过抗体降解而释放。(参见美国公开No.2005/0238649,其通过引用整体并入本文)。

[0240] 在数个实施方案中,接头在细胞外环境中对切割具有抗性。例如,当缀合物存在于细胞外环境中(例如在血浆中)时,缀合物样品中不超过约20%、不超过约15%、不超过约10%、不超过约5%、不超过约3%、或不超过约1%的接头被切割。接头在细胞外环境中是否对切割具有抗性可以例如如下确定:将包含目的接头的缀合物与血浆孵育预定时间(例如2小时、4小时、8小时、16小时或24小时),然后量化存在于血浆中的游离效应分子或可检测标志物的量。可以用于缀合物的不同示例性接头在W0 2004-010957、美国公开No.2006/0074008、美国公开No.20050238649和美国公开No.2006/0024317中描述,其各自通过引用整体并入本文。

[0241] 在数个实施方案中,提供了CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分与一种或更多种小分子毒素的缀合物,所述小分子毒素例如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素生物碱、多拉司他汀类、奥瑞斯他汀类、单端孢霉烯和CC1065,以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。

[0242] 适合用作美登木素生物碱毒素部分的美登素化合物是本领域公知的,并且可以根据已知方法从天然来源分离,可以使用遗传工程技术产生(参见Yu等,(2002)PNAS 99:7968-7973),或者可以是根据已知方法合成制备的美登醇和美登醇类似物。美登木素生物碱是通过抑制微管蛋白聚合来起作用的有丝分裂抑制剂。美登素首次从东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata)分离(美国专利No.3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生美登

木素生物碱,例如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利No.4,151,042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物在例如以下中公开:美国专利No.4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663和4,371,533,其各自通过引用并入本文。包含美登木素生物碱的缀合物、其制备方法以及其治疗用途在例如美国专利No.5,208,020;5,416,064;6,441,163和欧洲专利EP 0 425 235 B1中公开,其公开内容在此明确地通过引用并入。

[0243] 另外的毒素可以与CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分一起使用。示例性毒素包括假单胞菌外毒素(PE)、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素及其亚基、核毒素(ribotoxin)、核糖核酸酶、皂草素和加利车霉素,以及肉毒杆菌毒素A至F。这些毒素是本领域公知的并且许多可以容易地从商业来源获得(例如Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)。预期的毒素还包括毒素的变体(参见例如参见美国专利No.5,079,163和4,689,401)。

[0244] 皂草素是来源于肥皂草(*Saponaria officinalis*)的毒素,其通过使核糖体复合物的60S部分失活来破坏蛋白质合成(Stirpe等, *Bio/Technology*, 10:405-412, 1992)。然而,该毒素不具有特异性进入细胞内的机理,并且因此需要与被内化的识别细胞表面蛋白的抗体或抗原结合片段缀合以被细胞有效地摄取。

[0245] 白喉毒素从白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)分离。通常,用于免疫毒素的白喉毒素是突变的以降低或消除非特异性毒性。具有完全酶活性但显著降低的非特异性毒性的称为CRM107的突变体自20世纪70年代以来就为人所知(Laird和Groman, *J. Virol.* 19:220, 1976),并且一直用于人临床试验。参见美国专利No.5,792,458和美国专利No.5,208,021。

[0246] 蓖麻毒素是来自蓖麻(*Ricinus communis*) (蓖麻子(*Castor bean*))的凝集素RCA60。对于蓖麻毒素的一些实例,参见美国专利No.5,079,163和美国专利No.4,689,401。蓖麻凝集素(*Ricinus communis* agglutinin, RCA)以两种形式存在,其根据其约65kD和120kD的分子量分别表示为RCA<sub>60</sub>和RCA<sub>120</sub> (Nicholson&Blaustein, *J. Biochim. Biophys. Acta* 266:543, 1972)。A链负责使蛋白质合成失活和杀伤细胞。B链使蓖麻毒素与细胞表面半乳糖残基结合和促进A链转运到细胞溶质内(Olsnes等, *Nature* 249:627-631, 1974和美国专利No.3,060,165)。

[0247] 还曾使核糖核酸酶与靶向分子缀合以用作免疫毒素(参见Suzuki等, *Nat. Biotech.* 17:265-70, 1999)。示例性的核毒素例如 $\alpha$ -帚曲毒素( $\alpha$ -sarcin)和局限曲菌素在例如Rathore等, *Gene* 190:31-5, 1997;以及Goyal和Batra, *Biochem.* 345 Pt 2:247-54, 2000中讨论。加利车霉素首次从棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)分离并且是导致凋亡的引起DNA中双链断裂的烯二炔抗肿瘤抗生素家族的成员(参见例如Lee等, *J. Antibiot.* 42:1070-87, 1989)。该药物是临床试验中免疫毒素的毒性部分(参见例如Gillespie等, *Ann. Oncol.* 11:735-41, 2000)。

[0248] 相思豆毒素包括来自相思子(*Abrus precatorius*)的毒性凝集素。毒性成分相思豆毒素a、b、c和d的分子量为约63kD至67kD并且由两条二硫化物连接的多肽链A和B构成。A链抑制蛋白质合成;B链(相思豆毒素-b)与D-半乳糖残基结合(参见Funatsu等, *Agr. Biol. Chem.* 52:1095, 1988;和Olsnes, *Methods Enzymol.* 50:330-335, 1978)。

[0249] 对本文所公开的一种或更多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞、单克隆抗体、其抗原结合片段还可以与可检测标志物缀合；例如，能够通过以下进行检测的可检测标志物：ELISA、分光光度法、流式细胞术、显微术或诊断成像技术（例如计算机断层摄影术（CT）、计算机轴向断层摄影术（CAT）扫描、磁共振成像（MRI）、核磁共振成像NMRI）、磁共振断层摄影术（MTR）、超声、纤维光学检查和腹腔镜检查。可检测标志物的具体非限制性实例包括荧光团、化学发光剂、酶连接物、放射性同位素和重金属或化合物（例如用于通过MRI检测的超顺磁性铁氧化物纳米晶体）。例如，可用的可检测标志物包括荧光化合物，包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧系元素磷光体等。还使用生物发光标志物，例如萤光素酶、绿色荧光蛋白（GFP）、黄色荧光蛋白（YFP）。CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分还可以与可用于检测的酶缀合，例如辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶等。当CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分与可检测酶缀合时，其可以通过添加被该酶用于产生可辨别的反应产物的另外试剂来检测。例如，当存在试剂辣根过氧化物酶时，过氧化氢和二氨基联苯胺的添加产生在视觉上可检测的有色反应产物。CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分还可以与生物素缀合，并且通过间接测量抗生物素蛋白或链霉亲和素结合来检测。应注意的是，抗生物素蛋白本身可以与酶或荧光标记缀合。

[0250] CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分可以与顺磁性试剂（例如钆）缀合。顺磁性试剂（例如超顺磁性铁氧化物）也用作标记。抗体还可以与镧系元素（例如铈和镱）和锰缀合。抗体或抗原结合片段还可以用被第二报道子识别的预定多肽表位（例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签）标记。

[0251] CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分还可以与放射性标记的氨基酸缀合。放射性标记可以用于诊断和治疗目的二者，例如，放射性标记可以用于通过x射线、发射谱或其他诊断技术来检测本文所公开的一种或更多种抗原和抗原表达细胞。另外，放射性标记可以在治疗上用作在对象中治疗肿瘤的毒素，例如用于治疗神经母细胞瘤。用于多肽的标记的一些实例包括但不限于以下放射性同位素或放射性核苷酸： $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 。

[0252] 检测这样的可检测标志物的方法是本领域技术人员公知的。因此，例如放射性标记可以使用胶片或闪烁计数器来检测，荧光标志物可以使用光检测器检测发射的光照进行检测。酶标记通常通过向酶提供底物并检测通过酶在底物上作用产生的反应产物来检测，并且比色标记通过简单地可视化着色标记来检测。

[0253] D. 核苷酸、表达、载体和宿主细胞

[0254] 本发明的一个实施方案还提供了包含编码本文所述的任何CAR、抗体、或其抗原结合部分（包括其功能性部分和功能性变体）的核苷酸序列的核酸。本发明的核酸可以包含编码本文所述的任何前导序列、抗原结合结构域、跨膜结构域和/或细胞内T细胞信号转导结构域的核苷酸序列。

[0255] 在一些实施方案中，核苷酸序列可以是经密码子修饰的。不受特定理论束缚，认为核苷酸序列的密码子优化提高mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可以涉及用另一个密码子替代天然密码子，所述另一个密码子编码相同的氨基酸但可以被更容易在细胞内获得的tRNA翻译，由此提高翻译效率。核苷酸序列的优化还可以减少可能干扰翻译



的次级mRNA结构,由此提高翻译效率。

[0256] 在本发明的一个实施方案中,核酸可以包含编码本发明CAR的抗原结合结构域的经密码子修饰的核苷酸序列。在本发明的另一个实施方案中,核酸可以包含编码本文所述的任何CAR(包括其功能性部分和功能性变体)的经密码子修饰的核苷酸序列。

[0257] 本文所用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常意指DNA或RNA聚合物,其可以是单链的或双链的、合成的或从天然来源获得的(例如分离的和/或纯化的);其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸;并且其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸间连接,例如氨基磷酸酯连接或硫代磷酸酯连接,代替在未经修饰寡核苷酸的核苷酸之间发现的磷酸二酯。在一些实施方案中,核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或替换。然而,如本文所讨论的,在一些情况下对核酸而言,包含一个或更多个插入、缺失、倒位和/或替换可以是合适的。

[0258] 重组核酸可以是具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两个在其他情况下分离的序列片段制备的序列的核酸。这种人工组合通常通过化学合成或更常见地通过人工操作分离的核酸片段,例如通过遗传工程技术,例如Sambrook等(同上)中所述的那些来实现。核酸可以使用本领域已知的操作基于化学合成和/或酶促连接反应来构建。参见例如Sambrook等(同上)和Ausubel等(同上)。例如,核酸可以使用天然存在核苷酸或被设计成提高分子的生物稳定性或提高在杂交后形成的二联体的物理稳定性的经不同修饰的核苷酸(例如硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)来化学合成。可用于产生核酸的经修饰核苷酸的一些实例包括但不限于5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 $\beta$ -D-半乳糖基腺苷(queosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 $\beta$ -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-羧乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。或者,本发明的一种或更多种核酸可以从公司,例如Integrated DNA Technologies(Coralville,IA,USA)购买。

[0259] 核酸可以包含编码任何CAR或其功能性部分或功能性变体的任何分离或经纯化的核苷酸序列。或者,核苷酸序列可以包含任何序列的简并核苷酸序列或简并序列的组合。

[0260] 一个实施方案还提供了分离或经纯化的核酸,其包含与本文所述任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或在严格条件下与本文所述任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0261] 在严格条件下杂交的核苷酸序列可以在高严格性条件下杂交。“高严格性条件”意指核苷酸序列以可检测地强于非特异性杂交的量与靶序列(本文所述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格性条件包括可以使具有精确互补序列的多核苷酸或仅包含少数分散错配的多核苷酸与偶然具有几个与核苷酸序列匹配的小区域(例如3至10个碱基)的随机序列区分开的条件。与具有14至17个碱基或更多碱基的全长互补物相比,这样的小互补

性区域更容易解链,并且高严格性杂交使其容易可区分。相对高严格性条件可以包括例如低盐和/或高温条件,例如由在约50℃至70℃的温度下约0.02M至0.1M NaCl或等同物提供的。这样的高严格性条件容许核苷酸序列与模板链或靶标链之间的很少(如果有的话)错配,并且特别地适合于检测任何本发明CAR的表达。通常可以理解的是,通过添加递增量的甲酰胺可以使条件更加严格。

[0262] 还提供了包含以下核苷酸序列的核酸,所述核苷酸序列与本文所述的任何核酸具有至少约70%或更高,例如约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性。

[0263] 在一个实施方案中,核酸可以并入到重组表达载体中。在这点上,一个实施方案提供了包含任何核酸的重组表达载体。出于本文的目的,术语“重组表达载体”意指以下经遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,其当该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列并且使载体与细胞在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下接触时允许宿主细胞表达该mRNA、蛋白质、多肽或肽。载体整体上不是天然存在的。

[0264] 然而,载体的部分可以是天然存在的。重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,其可以是单链的或双链的、合成的或部分从天然来源获得的,并且其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在或非天然存在的核苷酸间连接,或两种类型的连接。优选地,非天然存在或被改变的核苷酸或核苷酸间连接不阻碍载体的转录或复制。

[0265] 在一个实施方案中,重组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细胞。合适的载体包括针对增殖和扩增或针对表达或二者而设计的那些,例如质粒和病毒。载体可以选自pUC系列(Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD)、pBluescript系列(Stratagene, La Jolla, CA)、pET系列(Novagen, Madison, WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)和pEX系列(Clontech, Palo Alto, CA)。

[0266] 还可以使用噬菌体载体例如 $\lambda$ DT10、 $\lambda$ DT11、 $\lambda$ ZapII(Stratagene)、EMBL4和 $\lambda$ NMI 149。植物表达载体的一些实例包括pBI01、pBI101.2、pBH01.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的一些实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可以是病毒载体,例如逆转录病毒载体或慢病毒载体。慢病毒载体是来源于慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括自我失活慢病毒载体,如Milone等,Mol. Ther. 17(8): 1453-1464(2009)中提供的。可以用于临床的慢病毒载体的另一些实例包括例如但不限于来自Oxford BioMedica plc的LENTIVECTOR.RTM.基因递送技术、来自Lentigen的LENTIMAX.TM.载体系统等。慢病毒载体的非临床类型也是可用的并且是本领域技术人员已知的。

[0267] 多种转染技术是本领域公知的(参见例如Graham等,Virology, 52:456-467(1973); Sambrook等(同上); Davis等, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier(1986); 以及Chu等, Gene, 13:97(1981))。

[0268] 转染方法包括磷酸钙共沉淀(参见例如Graham等, 同上)、直接微注射到培养的细胞内(参见例如Capecchi, Cell, 22:479-488(1980))、电穿孔(参见例如Shigekawa等, BioTechniques, 6:742-751(1988))、脂质体介导的基因转移(参见例如Mannino等,

BioTechniques, 6:682-690 (1988))、脂质介导的转导(参见例如Feigner等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84:7413-7417 (1987))和使用高速微型射弹的核酸递送(参见例如Klein等, Nature, 327:70-73 (1987))。

[0269] 在一个实施方案中,重组表达载体可以使用例如Sambrook等(同上)和Ausubel等(同上)中描述的标准重组DNA技术来制备。环形或线性的表达载体构建体可以制备成包含在原核或真核宿主细胞中具有功能性的复制系统。复制系统可以来源于例如ColE1、2 $\mu$ 质粒、 $\lambda$ 、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0270] 重组表达载体可以包含调节序列,例如转录和翻译起始和终止密码子,所述调节序列对需向其中引入载体的宿主细胞的类型(例如细菌、真菌、植物或动物)具有特异性,这视情况而定并且考虑载体是基于DNA还是基于RNA。重组表达载体可以包含限制性位点以有利于克隆。

[0271] 重组表达载体可以包含一个或更多个允许选择转化或转染的宿主细胞的标记基因。标记基因包括杀生物剂抗性,例如抗生素、重金属抗性等;营养缺陷型宿主中提供原养型的互补等。用于本发明表达载体的合适的标记基因包括例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因和氨苄西林抗性基因。

[0272] 重组表达载体可以包含与编码CAR(包括其功能性部分和功能性变体)的核苷酸序列或与与编码CAR之核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列可操作连接的天然或非天然启动子。启动子的选择(例如强的、弱的、诱导型的、组织特异性的和发育特异性的)在技术人员的普通技术之内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技术之内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子或在鼠干细胞病毒的长末端重复中发现的启动子。

[0273] 重组表达载体可以被设计用于瞬时表达、用于稳定表达或用于二者。另外,重组表达载体可以被制成用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0274] 此外,重组表达载体可以被制备成包含自杀基因。本文所用的术语“自杀基因”是指引起表达该自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是以下基因:其赋予表达该基因的细胞以针对试剂例如药物的敏感性,并且当使细胞与试剂接触或暴露于试剂时引起细胞死亡。自杀基因是本领域已知的(参见例如Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004)并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基还原酶。

[0275] 一个实施方案还提供了包含本文所述的任何重组表达载体的宿主细胞。本文所用的术语“宿主细胞”是指可以包含本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞,例如植物、动物、真菌或藻类,或者可以是原核细胞,例如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即直接从生物体(例如人)分离。宿主细胞可以是黏附细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。合适的宿主细胞是本领域已知的并且包括例如DH5a大肠杆菌(E.coli)细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。出于扩增或复制重组表达载体的目的,宿主细胞可以是原核细胞,例如DH5a细胞。出于产生重组CAR的目的,宿主细胞可以是哺乳动物细胞。宿主细胞可以是人细胞。当宿主细胞可以是任何细胞类型,可以来源于任何类型的组织,并且可以在任何发育阶段时,宿主细胞可以是

外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte,PBL)或外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)。宿主细胞可以是T细胞。

[0276] 出于本文的目的,T细胞可以是任何T细胞,例如培养的T细胞,例如原代T细胞,或来自培养的T细胞系的T细胞,例如Jurkat、SupT1等,或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得,则T细胞可以从许多来源获得,包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或者其他组织或流体。T细胞还可以是经富集或纯化的。T细胞可以是人T细胞。T细胞可以是分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞并且可以在任何发育阶段,包括但不限于CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>双阳性T细胞、CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8<sup>+</sup>T细胞(例如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、记忆干细胞(即,Tscm)、幼稚T细胞等。T细胞可以是CD8<sup>+</sup>T细胞或CD4<sup>+</sup>T细胞。

[0277] 在一个实施方案中,本文所述的CAR可以用于合适的非T细胞。这样的细胞是具有免疫效应功能的那些,例如NK细胞和由多能干细胞产生的T样细胞。

[0278] 一个实施方案还提供了包含至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群。细胞群可以是异质的群体,其包含含有所述任何重组表达载体的宿主细胞以及至少一种其他细胞,例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞(例如T细胞)或不同于T细胞的细胞,例如B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞等。或者,细胞群可以是基本上同质的群体,其中该群体主要包含含有重组表达载体的宿主细胞(例如基本上由其组成)。该群体还可以是克隆细胞群,其中该群体中的所有细胞都是包含重组表达载体的单宿主细胞的克隆,使得该群体中的所有细胞都包含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,细胞群如本文所述是包含含有重组表达载体的宿主细胞的克隆群。

[0279] CAR(包括其功能性部分和变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)可以是分离和/或经纯化的。例如,经纯化的(或分离的)宿主细胞制备物是其中宿主细胞比在其体内天然环境中的细胞纯度更高的宿主细胞制备物。这样的宿主细胞可以例如通过标准纯化技术来产生。在一些实施方案中,宿主细胞的制备物被纯化使得宿主细胞代表制备物的总细胞含量的至少约50%,例如至少约70%。例如,纯度可以为至少约50%,可以大于约60%、约70%或约80%,或者可以为约100%。

#### [0280] E. 治疗方法

[0281] 预期本文所公开的CAR可以用于在哺乳动物中治疗或预防疾病的方法。在这点上,一个实施方案提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,其包括以在该哺乳动物中有效地治疗或预防癌症的量向该哺乳动物施用CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体和/或其抗原结合部分,和/或药物组合物。

[0282] 一个实施方案还包括在施用本文所公开的CAR之前对哺乳动物进行淋巴细胞清除(lymphodeplete)。淋巴细胞清除的一些实例包括但不限于非骨髓性淋巴细胞清除化学治疗、骨髓性淋巴细胞清除化学治疗、全身照射等。

[0283] 出于其中施用宿主细胞或细胞群的方法的目的,细胞可以是哺乳动物同种异体或自体的细胞。优选地,细胞是哺乳动物自体的。如本文所用的,同种异体意指以下任何材料,其与该材料被引入的个体来源于相同物种的不同动物。当一个或多个基因座的基因不同时,两个或多个个体被认为彼此是同种异体的。在一些方面,来自相同物种的个体的同种异体材料可以在遗传上充分不相似以在抗原性上相互作用。本文所用的“自体的”意指以

下任何材料,其来源于与该材料稍后被重新引入到的个体中的同一个体。

[0284] 本文提及的哺乳动物可以是任何哺乳动物。本文所用的术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于啮齿目的哺乳动物,例如小鼠和仓鼠;和兔形目的哺乳动物,例如兔。哺乳动物可以来自食肉目,包括猫科(猫)和犬科(犬)。哺乳动物可以来自偶蹄目,包括牛科(牛)和猪科(猪);或者是奇蹄目,包括马科(马)。哺乳动物可以是灵长目、Ceboid目或Simoid目(猴);或者是类人猿目(人和猿)。优选地,哺乳动物是人。

[0285] 关于方法,癌症可以是任何癌症,包括以下中的任一种:急性淋巴细胞癌症、急性髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、膀胱癌症(例如膀胱癌)、骨癌、脑癌(例如髓母细胞瘤)、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓癌、结肠癌、食管癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠类癌肿瘤、头颈癌(例如头颈鳞状细胞癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体肿瘤、肝癌、肺癌(例如非小细胞肺癌和肺腺癌)、淋巴瘤、间皮瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、B-慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、滑膜肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌和输尿管癌。

[0286] 本文所用的术语“治疗”和“预防”以及来源于其的词语并不一定意指100%或完全的治疗或预防。相反,存在本领域普通技术人员视为具有潜在益处或治疗效果的不同程度的治疗或预防。在这一方面,所述方法可以在哺乳动物中提供任何量或任何水平的癌症治疗或预防。

[0287] 此外,由所述方法提供的治疗或预防可以包括治疗或预防被治疗或预防的疾病(例如癌症)的一种或更多种状况或症状。另外,出于本文的目的,“预防”可以涵盖延迟疾病或其症状或状况的发作。

[0288] 另一个实施方案提供了在哺乳动物中检测癌症的存在的方法,其包括:(a)使包含来自哺乳动物的一种或更多种细胞的样品与CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体和/或其抗原结合部分、或药物组合物接触,从而形成复合物;(b)以及检测复合物,其中复合物的检出指示哺乳动物中癌症的存在。

[0289] 样品可以通过任何合适的方法(例如活检或尸体剖检)获得。活检是从个体中移出组织和/或细胞。这样的移出可以是为了从个体中收集组织和/或细胞以对所移出的组织和/或细胞进行实验。该实验可以包括确定个体是否已患有和/或患有特定病症或疾病状态的实验。该病症或疾病可以是例如癌症。

[0290] 对于在哺乳动物中检测增生性病症(例如癌症)的存在的方法的一个实施方案,包含哺乳动物的细胞的样品可以是包含全细胞、全细胞裂解物、或全细胞裂解物的级分(例如细胞核或细胞质级分、全蛋白质级分或核酸级分)的样品。如果样品包含全细胞,则细胞可以是哺乳动物的任何细胞,例如任何器官或组织的细胞,包括血细胞或内皮细胞。

[0291] 对于哺乳动物,接触可以发生在体外或体内。优选地,接触是在体外。

[0292] 另外,复合物的检测可以通过本领域已知的任意数量的方式进行。例如,本文所述的本文所公开CAR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、或者抗体或其抗原结合部分可以用可检测标记进行标记,所述可检测标记例如如上文所公开的放射性同位

素、荧光团(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE))、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(例如金颗粒)。

[0293] 测试CAR识别靶细胞的能力和抗原特异性的方法是本领域已知的。例如,Clay等,J. Immunol, 163:507-513 (1999) 教导了测量细胞因子(例如干扰素- $\gamma$ 、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )或白介素2(IL-2))的释放的方法。此外,CAR功能可以通过测量细胞的细胞毒性来评价,如Zhao等,J. Immunol. 174:4415-4423 (2005) 中所述。

[0294] 另一个实施方案提供了本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体或其抗原结合部分、和/或药物组合物用于在哺乳动物中治疗或预防增生性病症(例如癌症)的用途。癌症可以是本文所述的任何癌症。

[0295] 任何施用方法都可以用于公开的治疗剂,包括局部和系统施用。例如,可以使用表面、经口、血管内(例如静脉内)、肌内、腹膜内、鼻内、皮内、鞘内和皮下施用。具体的施用模式和剂量方案将由主治临床医师考虑病例的具体情况(例如对象、疾病、涉及的疾病状态和治疗是否是预防性的)来选择。在其中施用多于一种药剂或组合物的情况下,可以使用一种或更多种施途径;例如化学治疗剂可以经口施用并且抗体或抗原结合片段或缀合物或组合物可以静脉内施用。施用方法包括注射,在此情况下,在例如以下的无毒可药用载体中提供CAR、CAR T细胞、缀合物、抗体、抗原结合片段或组合物:水、盐水、林格溶液、右旋糖溶液、5%人血清白蛋白、不挥发油、油酸乙酯或脂质体。在一些实施方案中,可以使用所公开化合物的局部施用,例如通过将抗体或抗原结合片段施加到已从中除去肿瘤的组织区域,或被怀疑倾向于肿瘤发生的区域。在一些实施方案中,包含治疗有效量抗体或抗原结合片段的药物制剂的持续瘤内(或肿瘤附近)释放可以是有益的。在另一些实例中,缀合物作为滴眼剂表面施加到角膜,或玻璃体内施加到眼内。

[0296] 所公开的治疗剂可以被配制成适合于精确剂量的单次施用的单位剂量形式。此外,所公开的治疗剂可以以单剂量或以多剂量方案来施用。多剂量方案是以下方案:其中初级治疗过程可以具有多于一个单独剂量,例如1至10个剂量,然后以后续时间间隔根据需要给予其他剂量以维持或加强组合物作用。治疗可以涉及在数天至数月或甚至数年的时期内的化合物的日剂量或多个日剂量。因此,剂量方案还将至少部分地基于待治疗对象的特定需求来确定并且将取决于施用医师的判断。

[0297] 抗体或缀合物的通常剂量可以为约0.01mg/kg至约30mg/kg,例如约0.1mg/kg至约10mg/kg。

[0298] 在一些具体实例中,基于多次每日给药方案(例如至少连续2天、连续10天等)向对象施用包含一种或更多种缀合物、抗体、组合物、CAR、CAR T细胞或另外药剂的治疗性组合物例如数周、数月或数年的时间。在一个实例中,向对象施用缀合物、抗体、组合物或另外的药剂至少30天,例如至少2个月、至少4个月、至少6个月、至少12个月、至少24个月或至少36个月的时间。

[0299] 在一些实施方案中,所公开的方法包括与所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、CAR或表达CAR的T细胞组合(例如依次地、基本上同时或同时)向对象提供外科手术、放射治疗和/或化学治疗。这样的药剂和治疗的方法和剂量是本领域技术人员已知的,并且可以由熟练的临床医师来确定。用于另外药剂的制备和给药方案可以根据制造商的说明来使

用或如由技术人员凭经验确定的。用于这样的化学治疗的制剂和给药方案还在 Chemotherapy Service, (1992) 编辑, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md 中描述。

[0300] 在一些实施方案中, 组合治疗可以包括向对象施用治疗有效量的另外的癌症抑制剂。可以用于组合治疗的另外治疗剂的非限制性实例包括微管结合剂、DNA 嵌入剂或交联剂、DNA 合成抑制剂、DNA 和 RNA 转录抑制剂、抗体、酶、酶抑制剂、基因调节剂和血管生成抑制剂。这些药剂 (其以治疗有效量施用) 和治疗可以单独或组合使用。例如, 任何合适的抗癌剂或抗血管生成剂都可以与本文所公开的 CAR、CAR-T 细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物组合施用。这样的药剂的方法和治疗剂量是本领域技术人员已知的, 并且可以由熟练的临床医师来确定。

[0301] 另外的化学治疗剂包括但不限于烷化剂, 例如氮芥 (nitrogen mustard) (例如苯丁酸氮芥、氯甲胺 (chlormethine)、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑)、亚硝基脲 (例如卡莫司汀、福莫司汀、洛莫司汀和链佐星)、铂化合物 (例如卡铂、顺铂、奥沙利铂和 BBR3464)、白消安、达卡巴嗪、二氯甲二乙胺、丙卡巴肼、替莫唑胺、噻替派和尿嘧啶氮芥; 抗代谢物, 例如叶酸 (例如氨甲蝶呤、培美曲塞和雷替曲塞)、嘌呤 (例如克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨、巯基嘌呤和兰快舒 (tioguanine))、嘧啶 (例如卡培他滨)、阿糖胞苷、氟尿嘧啶和吉西他滨; 植物生物碱, 例如鬼臼 (例如依托泊苷和替尼泊苷)、紫杉烷类 (例如多西他赛和紫杉醇)、长春花类 (例如长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨); 细胞毒性/抗肿瘤抗生素, 例如蒽环类家族成员 (例如柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌和戊柔比星)、博来霉素、利福平、羟基脲 (hydroxyurea) 和丝裂霉素; 拓扑异构酶抑制剂, 例如拓扑替康和伊立替康; 单克隆抗体, 例如阿仑单抗、贝伐珠单抗、西妥昔单抗、吉姆单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗和曲妥珠单抗; 光敏剂, 例如氨基乙酰丙酸、氨基乙酰丙酸甲酯、卟吩姆钠和维替泊芬; 以及其他药剂, 例如阿利维 A 酸、六甲蜜胺、安吖啶、阿那格雷、三氧化二砷、天冬酰胺酶、阿西替尼、贝沙罗汀、贝伐珠单抗、硼替佐米、塞来昔布、地尼白介素 (denileukin diftitox)、厄洛替尼、雌莫司汀、吉非替尼、羟基脲 (hydroxycarbamide)、伊马替尼、拉帕替尼、帕唑帕尼、喷司他丁、马索丙考、米托坦、培门冬酶、他莫昔芬、索拉非尼、舒尼替尼、维罗非尼 (vemurafinib)、凡德他尼和维甲酸。这样的药剂的选择和治疗剂量是本领域技术人员已知的, 并且可以由熟练的临床医师来确定。

[0302] 组合治疗可以提供协同作用并且证明具有协同性, 即当活性成分一起使用时达到的效果大于由单独使用化合物产生的效果的总和。当活性成分: (1) 在组合的单位剂量制剂中共配制并同时施用或递送; (2) 以单独制剂交替或并行递送; 或 (3) 通过另一些方案进行时, 可以获得协同作用。当交替递送时, 当化合物依次施用或递送, 例如在单独的注射器中通过不同的注射剂依次施用或递送时, 可以获得协同作用。通常来说, 在交替期间, 每种活性成分的有效剂量依次施用, 即先后施用, 然而在组合治疗中, 两种或更多种活性成分的有效剂量一起施用。

[0303] 在一个实施方案中, 在抗癌治疗后向患有肿瘤的对象施用有效量的与一种或更多种本文所公开抗原特异性结合的抗体或抗原结合片段或其缀合物。在已经过足够时间量以允许施用的抗体或抗原结合片段或缀合物与在对应癌细胞上表达的抗原形成免疫复合物之后, 检测免疫复合物。免疫复合物的存在 (或不存在) 指示治疗的有效性。例如, 与在治疗

前获取的对照相比免疫复合物增加指示该治疗是无效的,然而与在治疗前获取的对照相比免疫复合物减少指示该治疗是有效的。

#### [0304] F. 生物药物组合物

[0305] 本文提供了用于基因治疗、免疫治疗和/或细胞治疗的生物药物组合物或生物制剂组合物(在下文中“组合物”),其包括在载体(例如可药用载体)中的与一种或更多种本文所公开抗原特异性结合的一种或更多种所公开CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、缀合物、CAR、或表达CAR的T细胞。组合物可以以单位剂量形式制备用于向对象施用。施用的量和时机由治疗临床医师决定以达到期望结果。组合物可以被配制用于系统(例如静脉内)或局部(例如瘤内)施用。在一个实例中,所公开的CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、缀合物被配制用于肠胃外施用,例如静脉内施用。包含本文所公开CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的组合物用于例如肿瘤的治疗和检测,所述肿瘤例如但不限于神经母细胞瘤。在一些实例中,组合物可用于癌的治疗或检测。包含如本文所公开的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的组合物还用于例如病理性血管生成的检测。

[0306] 用于施用的组合物可以包括溶解在可药用载体(例如水性载体)中的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的溶液。可以使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的并且通常不含不期望的物质。这些组合物可以通过常规的公知灭菌技术来灭菌。这些组合物可以根据需要包含可药用的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、辅助剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物的浓度可以广泛地变化,并且根据所选具体施用模式和对象需求将主要基于流体体积、黏度、体重等来选择。制备这样的剂型用于基因治疗、免疫治疗和/或细胞治疗的实际方法对于本领域技术人员是已知的或将是明显的。

[0307] 用于静脉内施用的典型组合物包含约0.01mg/kg至约30mg/kg的抗体或抗原结合片段或缀合物/对象/天(或对应剂量的包含抗体或抗原结合片段的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物)。用于制备可施用组合物的实际方法对本领域技术人员是已知或明显的并且在例如Remington's Pharmaceutical Science,第19版,Mack Publishing Company,Easton, PA (1995)的出版物中更详细地描述。

[0308] CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物可以以冻干形式提供并且在施用前用无菌水再水化,但是其也以已知浓度的无菌溶液提供。然后将CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物溶液添加到含有0.9%氯化钠(USP)的输注袋中,并且在一些情况下以0.5mg/kg至15mg/kg体重的剂量施用。本领域中在抗体或抗原结合片段和缀合物药物的施用方面有相当多的经验可供使用;例如自1997年Rituxan®获批以来,抗体药物一直在美国销售。CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段及其缀合物可以通过缓慢输注而不是以静脉内推注或浓注来施用。在一个实例中,施用较高的负荷剂量,随后以较低水平施用维持剂量。例如,可以在大约90分钟的时间内输注4mg/kg抗体或抗原结合片段的初始负荷剂量(或包含抗体或抗原结合片段的缀合物的对应剂量),随后如果在前剂量耐受良好,则在30分钟时间内输注2mg/kg的每周维持剂量进行4至8周。

[0309] 受控释放肠胃外制剂可以被制备成植入物、油性注射剂或制备成颗粒系统。对于



蛋白质递送系统的概述,参见Banga,A.J.,Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation,Processing,and Delivery Systems,Technomic Publishing Company, Inc.,Lancaster,PA,(1995)。颗粒系统包括微球体、微粒、微胶囊剂、纳米胶囊剂、纳米球体和纳米粒。微胶囊剂包含治疗性蛋白质(例如细胞毒素或药物)作为中心核。在微球体中,治疗剂分散在整个颗粒中。小于约1 $\mu$ m的颗粒、微球体和微胶囊剂通常分别是指纳米粒、纳米球体和纳米胶囊剂。毛细管的直径为约5 $\mu$ m使得只有纳米粒静脉内施用。微粒的直径通常为约100 $\mu$ m并且皮下或肌内施用。参见例如Kreuter,J.,Colloidal Drug Delivery Systems, J.Kreuter,编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York,NY,第219至342页(1994);和Tice& Tabibi,Treatise on Controlled Drug Delivery,A.Kydonieus编辑,Marcel Dekker, Inc.New York,NY,第315至339页(1992)。

[0310] 聚合物可以用于本文所公开的CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物组合物的离子控制释放。用于受控药物递送的多种可降解和不可降解的聚合物基质是本领域已知的(Langer,Accounts Chem.Res.26:537-542,1993)。例如,嵌段共聚物泊洛沙姆407在低温下作为黏性但是可活动的液体存在,但在体温下形成半固体凝胶。已经表明,其是用于重组白介素-2和脲酶的配制和持续递送的有效载剂(Johnston等,Pharm.Res.9: 425-434,1992;和Pec等,J.Parent.Sci.Tech.44(2):58-65,1990)。或者,羟基磷灰石已经作为微载体用于蛋白质的受控释放(Ijntema等,Int.J.Pharm.112:215-224,1994)。在另一方面,脂质体被用于脂质包封的药物的受控释放以及药物靶向(Betageri等,Liposome Drug Delivery Systems,Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,PA(1993))。许多用于治疗性蛋白质的受控递送的另外系统是已知的(参见美国专利No.5,055,303;美国专利No.5,188,837;美国专利No.4,235,871;美国专利No.4,501,728;美国专利No.4,837,028;美国专利No.4,957,735;美国专利No.5,019,369;美国专利No.5,055,303;美国专利No.5,514,670;美国专利No.5,413,797;美国专利No.5,268,164;美国专利No.5,004,697;美国专利No.4,902,505;美国专利No.5,506,206;美国专利No.5,271,961;美国专利No.5,254,342和美国专利No.5,534,496)。

#### [0311] G.药盒

[0312] 在一方面,还提供了使用本文所公开的CAR的药盒。例如,药盒用于在对象中治疗肿瘤,或用于制备表达本文所公开的一种或更多种CAR的CAR T细胞。如本文所公开的,药盒将通常包含所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞。药盒中可以包含多于一种所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞。

[0313] 药盒可以包含容器和在容器上或附在容器的标记或包装插入物。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料(例如玻璃或塑料)形成。容器通常容纳包含一种或更多种所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞的组合物。在一些实施方案中,容器可以具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有可通过皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标记或包装插入物指示该组合物用于治疗特定病症。

[0314] 标记或包装插入物通常还会包括例如在治疗或预防肿瘤或制备CAR T细胞的方法中使用所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞的说明书。包装插入物通常包括在治疗性产品的商业包装中通常包括的说明书,其包含关于与使用这

样的治疗性产品相关的适应证、用法、剂量、施用、禁忌和/或警告的信息。说明性材料可以以电子形式(例如计算机磁盘或压缩光盘)书写或可以是可视化的(例如视频文件)。药盒还可以包含有利于该药盒被设计用于的特定应用的另外组分。因此,例如,药盒可以另外地包含检测标记的工具(例如用于酶标记的酶底物、检测荧光标记的滤光器装置、合适的第二标记(例如第二抗体)等)。药盒可以另外地包含通常用于特定方法的实践的缓冲剂和其他试剂。这样的药盒和合适的内容物是本领域技术人员公知的。

## 实施例

[0315] 通过以下实施例对本发明进行进一步举例说明,这些实施例不应以任何方式解释为对本发明范围施加限制。相反,应清楚地理解,可以寻求多个其他实施方案、其修改方案和等同方案,其在本领域技术人员阅读本文的说明之后可以是明显的而不脱离本发明的精神和/或所附权利要求书的范围。

[0316] 实施例1.从完全人噬菌体展示的ScFv和VH分库中分离CD33特异性抗体

[0317] 材料和方法:

[0318] a) 人噬菌体展示的ScFv和VH CD33特异性抗体的产生

[0319] 使用由来自50名健康供体的外周血B细胞构建的幼稚人ScFv(免疫球蛋白的重组单链可变片段)噬菌体展示文库(大约多样性,具有 $10^{10}$ 种独特的特异性)(Z.Y.Zhu和D.S.Dimitrov,未公开的数据)和人HV(免疫球蛋白重链可变结构域)文库来选择重组人CD33特异性的ScFv或VH。将 $10^{12}$ 个噬菌体展示的ScFv或VH的经扩增文库在第一、第二和第三轮生物淘选期间分别与均匀分布在96孔板的5孔中的 $5 \times 100\text{-}\mu\text{l}$ 体积中的5、3和 $1\mu\text{g}$ 包被的CD33在室温下孵育两小时。在每一轮孵育后,将孔用含有0.05%Tween 20的磷酸盐缓冲盐水(PBST)对于第一轮洗涤5次,并且对于后面的轮洗涤10次,以除去非特异性结合的噬菌体,将结合的噬菌体与TG1感受态细胞于 $37^\circ\text{C}$ 下混合1小时,从感染的细胞中扩增噬菌体,并用于下一轮生物淘选。在第三轮生物淘选之后,使用自动化BioRobotics BioPick菌落挑选系统(Genomic Solutions,Ann Arbor,MI)从感染的TG1细胞随机挑选380个克隆,并且各自接种到96孔板中的 $150\mu\text{l}$ 含有 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 羧苄青霉素和0.2%葡萄糖的2YT培养基中。在细菌培养物达到 $600\text{nm}$ (OD $_{600}$ )处0.5的光密度后,将感染复数(multiplicity of infection, MOI)为10的辅助噬菌体M13K07和 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ (终浓度)的卡那霉素添加到培养基,并将板在 $30^\circ\text{C}$ 在250rpm的摇床上进一步孵育过夜。将噬菌体上清液与PBS中3%的脱脂乳以4:1的体积比混合,并且用于酶联免疫吸附测定(ELISA),以鉴定展示具有高CD33结合亲和力的ScFv或VH的噬菌体克隆。将上清液在室温下与96孔板中每孔 $50\text{ng}$ 包被的重组人CD33一起孵育2小时,并用PBST洗涤五次(在 $4^\circ\text{C}$ 下孵育过夜后,用PBS中的3%脱脂乳封闭并且用含0.05% Tween 20的PBS洗涤3次。)使用辣根过氧化物酶缀合的山羊抗M13抗体检测CD33结合的噬菌体。在与抗体孵育后,通过洗涤孔除去非特异性结合的抗体,并添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物,并测量在 $450\text{nm}$ 下的溶液吸光度(A $_{450}$ )。选择 $A_{450} > 1.0$ 的与CD33结合的克隆用于进一步表征。

[0320] b) 所选可溶性ScFv或VH的表达和纯化

[0321] 对所选克隆的VH和VL以及结构域结合物的VH进行DNA测序,并如下所述对由克隆编码的具有独特序列的ScFv或VH进行表达和纯化。将从这些克隆中提取的质粒用于HB2151

细胞的转化。从含有新鲜转化的细胞的板中挑出单个菌落,接种到含有100 $\mu$ g/ml氨苄青霉素和0.2%葡萄糖的200ml 2YT培养基中,并在37 $^{\circ}$ C下以250rpm摇动孵育。当培养物在600nm处的OD达到0.90时,添加终浓度为0.5mM的异丙基- $\beta$ -d-硫代半乳糖吡喃糖苷,并将培养物在30 $^{\circ}$ C下进一步孵育过夜。在8,000 $\times$ g下离心20分钟后收集细菌沉淀物,并将其重悬于含有0.5mU多粘菌素B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的PBS缓冲液中。在室温下以50rpm旋转孵育30分钟后,将重悬的沉淀物在4 $^{\circ}$ C下以25,000 $\times$ g离心25分钟,并且使用Ni-NTA树脂按照供应商方案(Qiagen)将上清液用于ScFv纯化。

[0322] c) ELISA结合测定

[0323] 将50 $\mu$ l PBS中的稀释的重组人CD33以2 $\mu$ g/ml在4 $^{\circ}$ C下在96孔板中包被过夜。将具有His和Flag标签的纯化的ScFv或VH(来自上文)连续稀释并添加到靶蛋白包被的孔中。洗涤之后,添加1:3000稀释的HRP缀合的抗-Flag抗体,在室温下持续1小时。洗涤之后,添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物,在室温下孵育10分钟之后,添加1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>以终止反应,并在450nm处读取O.D.以定量ScFv结合CD33的相对能力。

[0324] 结果:

[0325] 根据ELISA结合测定的结果,鉴定了四种对重组人CD33具有特异性的单独ScFs克隆并分别标记为人抗CD33 ScFv结合物m1033-9 (ScFv9)、m1033-10 (ScFv10)、m1033-12 (ScFv12) 和m1033-15 (ScFv15)。还从ELISA结合测定鉴定了两种独特的VH结构域结合物m1033-2 (VH-2) 和m1033-4 (VH-4)。下文实施例2中概述了表达VH-2、VH-4、ScFv9、ScFv10、ScFv12和ScFv15人抗CD33结合物的嵌合抗原受体的产生。

[0326] 实施例2. 表达抗CD33基于完全人仅重链Ig或基于scFv的结合序列的CAR

[0327] 在该实施例中,描述了来源于单链可变片段(scFv)结合物序列的新的完全人免疫球蛋白仅重链的抗CD33 CAR T细胞。新的抗CD33 CART构建体已表现出在原代人T细胞中的高水平表达,并且具有针对CD33阳性肿瘤细胞的特异性和有效的细胞毒性和细胞因子功能。

[0328] 智人(Homo sapiens) CD33(唾液酸结合Ig样凝集素3、SIGLEC3、SIGLEC-3、gp67、p67)是急性髓性白血病(AML)上的充分研究的靶标。CD33人源化抗体(林妥珠单抗(lintuzumab))和CD33抗体-药物缀合物(吉妥珠单抗或G0、Pfizer)表现出一定疗效,但在临床试验中未能显示出稳健的治疗益处(1. Feldman EJ等, J Clin Oncol 2005;23(18):4110-4116, 2. Petersdorf SH等, Blood 2013;121(24):4854-4860)。还正在研究AMG330,一种CD33-CD3双特异性T细胞衔接子(BiTE) (Krupka C等, Blood 2014 123:356-365)。截止到今年,G0已经以改变的、低得多的剂量和经过修改的方案重新引入临床,但是还需要积累足够的临床数据来重新评估该药剂。目前正在开发的另一种药剂CD33靶向抗体-药物缀合物vadastuximab talirine (SGN-CD33A)由于肝毒性最近在一些临床I/II期试验中被临床搁置(可在万维网investor.seattlegenetics.com/phoenix.zhtml?c=124860&p=irol-newsArticle&ID=2232880获得),从而突出了鉴定安全且有效的CD33靶向模式的迫切需要。

[0329] 使用在EF1a启动子的控制下的来源于免疫球蛋白VH结构域或全长ScFv的CD33结合序列设计了CD33 CAR,并且在体外测试了转导效率、杀伤功能和细胞因子产生。

[0330] 材料和方法:

[0331] (a) 细胞系

[0332] 人细胞系早幼粒细胞白血病HL-60、急性淋巴细胞白血病Reh、单核细胞白血病THP-1和骨髓性白血病K562细胞系购自美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection) (ATCC, Manassas, VA)。急性髓性白血病MOLM-14系购自德国微生物和细胞系保藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Lines) (DSMZ, Braunschweig Germany)。在补充有10%热灭活的胎牛血清的RPMI-1640培养基(ATCC)中培养细胞系。THP-1培养基还包含0.05%的β巯基乙醇。通过用具有或不具有GFP的编码萤火虫萤光素酶的慢病毒载体(Lentigen Technology, Inc., Gaithersburg, MD) 稳定转导野生型白血病细胞系,随后有限稀释并选择萤光素酶阳性克隆来产生萤光素酶表达亚克隆。

[0333] (b) 嵌合抗原受体(CAR)-表达载体的建立

[0334] CAR抗原结合结构域序列来源于人抗CD33 ScFv或重链可变片段。通过将结合物序列与CD8a连接和跨膜结构域(UniProt序列ID P01732, aa 138-206), 然后与4-1BB(CD137, aa 214-255, UniProt序列ID Q07011) 信号转导结构域和CD3ζ信号转导结构域(CD247, aa 52-163, 参考序列ID: NP\_000725.1) 框内连接来产生CAR T构建体。对于一些构建体, 使用CD28共刺激序列, 而不是4-1BB共刺激序列。在一些构建体中, 将CD8连接和/或跨膜结构域用来源于TNFRSF19蛋白的结构域替代。对于一些序列, 将截短的表皮生长因子受体(tEGFR) 标签通过2A肽并入到CAR构建体中, 以能够在体外标记转导的细胞, 以及用作体内应用的自杀开关。将CAR构建体序列克隆到第三代慢病毒质粒骨架(Lentigen Technology Inc., Gaithersburg, MD) 中。通过HEK 293T细胞的瞬时转染产生包含慢病毒载体(LV) 的上清液, 通过离心包含慢病毒载体的上清液使载体沉淀, 并储存在-80℃。

[0335] (c) 原代T细胞的纯化和转导

[0336] 来自正常供体的人原代T细胞在根据制造商的方案(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 对CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞进行免疫磁珠选择之后从血沉棕黄层中纯化, 在补充有40IU/ml IL-2的TexMACS培养基中以 $0.3 \times 10^6$ 个细胞/ml至 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml的密度进行培养, 用CD3/CD28**MACS**®GMP TransAct试剂(Miltenyi Biotec) 活化并在第2天在存在10μg/ml硫酸鱼精蛋白(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的情况下用编码CAR构建体的慢病毒载体转导过夜, 并在第4天更换培养基。在第3天, 将培养物转移到补充有200IU/ml IL-2的TexMACS培养基中, 并增殖直到在第7至10天收获。

[0337] (d) 免疫效应物测定(CTL和细胞因子)

[0338] 为了确定细胞介导的细胞毒性(CTL测定), 将用萤火虫萤光素酶稳定转导的5,000个靶细胞与CAR T细胞以多种效应物/靶标比组合并孵育过夜。向每个孔添加SteadyGlo试剂(Promega, Madison WI) 并将得到的发光量化为每秒的计数(样品CPS)。仅靶标的孔(最大CPS) 和仅靶标的孔加1%Tween-20(最小CPS) 用于确定测定范围。比裂解百分比计算为 $(1 - (\text{样品CPS} - \text{最小CPS}) / (\text{最大CPS} - \text{最小CPS}))$ 。移除E:T比为10:1的共培养物的上清液并且通过ELISA(eBioscience, San Diego, CA) 分析IFNγ、TNFα和IL-2的浓度。

[0339] (e) CAR表面表达的流式细胞术分析

[0340] 对于细胞染色, 从培养物中收获了五十万个CAR T转导细胞, 在补充有0.5%牛血清白蛋白(Miltenyi Biotec) 的冷AutoMACS缓冲液中洗涤两次, 并通过用CD33-Fc肽(R&D, Minneapolis, MN) 然后用抗Fc-AF647缀合物(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 染

色来检测CAR表面表达。未经转导的细胞用作阴性对照。通过7AAD染色 (BD Biosciences, San Jose, CA) 来排除所有研究中的死细胞。将细胞洗涤两次并重悬于200 $\mu$ l染色缓冲液中, 然后通过流式细胞术进行定量分析。在MACSQuant®10分析仪 (Miltenyi Biotec) 上进行流式细胞术分析, 并使用FlowJo软件 (Ashland, OR) 生成数据图。

[0341] (f) CAR T功能的体内分析

[0342] 在体内评估了靶向CD33的CAR T细胞的功能。在第0天向6至8周大的NSG小鼠 (每组6只) 接种 $1.0 \times 10^6$ 个MOLM-14 CD33<sup>+</sup>AML细胞。在第4天, 通过IVIS生物发光成像确定肿瘤负荷, 将小鼠随机分为平均肿瘤负荷相等的组, 并且在研究的第5天施用 $5.0 \times 10^6$ 个CAR T<sup>+</sup>细胞/小鼠。在第14、21、28和35天, 通过生物发光成像确定了肿瘤的消退。记录小鼠的存活并在研究结束时进行分析。为了确定CAR T和肿瘤细胞的存在, 在研究第19天从所有动物中收集血液。通过流式细胞术确定血液CAR T细胞和MOLM-14肿瘤细胞的绝对数目, 并通过MACSPlex细胞因子12人试剂盒 (Miltenyi Biotec) 按照制造商的方案在血浆中测量炎症细胞因子的水平。

[0343] (g) 小鼠血液中CAR T和肿瘤细胞的流式细胞术分析

[0344] 对于流式细胞术, 收集50 $\mu$ l血液并分析CAR T和MOLM-14肿瘤细胞数目。首先, 按照制造商的说明, 用红细胞裂解液 (Miltenyi Biotec) 裂解红细胞, 并且用人CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec) 和7-AAD (BD Biosciences, San Jose, CA) 对白细胞进行染色, 并通过MACSQuant 10流式细胞仪 (Miltenyi Biotec) 获取。在B1通道中检测稳定表达GFP报告基因的MOLM-14-细胞。从分析中排除了七个AAD阳性死细胞。为了促进对血液中人T细胞和MOLM-14数目的直接定量, 在获取之前将CountBright绝对计数珠 (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) 添加到每个样品, 并根据制造商的方案计算相应的绝对细胞数目。

[0345] (h) 长期CAR T和肿瘤共孵育测定

[0346] 将表达多种抗CD33 CAR构建体和对照的CART细胞系与肿瘤靶HL-60细胞以5:1至0.04:1的效应物与靶标比组合5或11天。包括阴性对照UTD (未经转导的细胞)、单独的T细胞 (E:T 1:0) 和表达GFP的T细胞 (1398)。在每个时间点, 将细胞用抗人CD33和CD3抗体以及7-AAD进行染色, 并且在MACSQuant 10流式细胞仪上获取。为了确定每种情况下存活的CAR T细胞和肿瘤细胞的百分比, 将细胞在正向和侧向散射单峰7-AAD<sup>-</sup>、CD3<sup>+</sup>或CD33<sup>+</sup>上进行设门。

[0347] 结果:

[0348] 为了评估新的抗CD33完全人ScFv结合序列, 设计了并入了仅重链结合物序列VH-2或VH-4或者ScFv序列ScFv9、ScFv10、ScFv12或ScFv15中的每一种作为肿瘤抗原结合结构域的CAR构建体。在每种CAR设计中, 肿瘤靶向结构域后面是来源于人CD8蛋白的接头和跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 信号转导结构域 (下文表1)。使用并入了来源于序列My96的ScFv结合结构域的构建体LTG1940作为参考对照或比较物。

[0349] 表1: CD33靶向CAR构建体的列表

[0350]

LTG1905:EF1a VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 $\zeta$
LTG1906:EF1a VH-4 CD33-CD8TM-4-1BB-CD3 $\zeta$
LTG1936:EF1a-ScFv9-CD8TM-4-1BB-CD3 $\zeta$
LTG1937:EF1a-ScFv10-CD8TM-4-1BB-CD3 $\zeta$

LTG1938:EF1a-ScFv12-CD33 CAR-CD8TM-4-1BB-CD3 $\zeta$
LTG1939:EF1a-ScFv15-CD33 CAR-CD8TM-4-1BB-CD3 $\zeta$
LTG1940:EF1a-My96_ScFv-CD33 CAR-CD8TM-4-1BB-CD3 $\zeta$

[0351] 用抗CD33嵌合抗原受体转导的T细胞表现出表面表达和细胞裂解活性。

[0352] a) 抗CD33 CAR的表面表达

[0353] 为了评估新的抗CD33 CAR,如材料和方法中所述产生编码在人EF1a启动子控制下的CAR构建体的慢病毒载体(LV)。然后,用编码CAR的四种慢病毒载体转导来自两个独立健康供体的人原代T细胞。来自相同供体的未经转导的细胞(NT)或来自相同供体的GFP转导的细胞用作阴性对照。

[0354] 如材料和方法中所述,在存在IL-2的情况下,在培养第0天用TransAct T细胞试剂(CD3和CD28抗原的活性衔接物,Miltenyi Biotec,Inc.)活化T细胞。在培养的第10天,通过CD33-Fc肽随后通过抗Fc-AF647并通过流式细胞术进行分析来检测抗CD33 CAR在T细胞表面上的表达。抗CD33 CAR构建体表现出表面CAR表达。

[0355] b) 抗CD33 CAR的细胞裂解测定

[0356] 为了证明产生的CAR T细胞的细胞裂解功能,使用稳定表达萤火虫萤光素酶的HL-60-luc、MOLM-14(CD33-高)、Reh-luc和K562-luc(CD33-低)白血病细胞系进行了基于萤光素酶的杀伤测定。将CART细胞与靶细胞以20、10和5的效应物与靶(E:T)比合并,并共孵育过夜,然后如材料和方法中所述通过发光评估细胞杀伤(图3图4;图6和图7)。当测试基于VH的抗CD33 CAR时,CAR T构建体LTG1906表现出对高CD33 HL-60-luc细胞系的强的E:T比依赖性细胞毒性,对更低CD33表达K562细胞系的中等细胞裂解,以及低CD33 Reh-luc细胞系的仅弱的细胞裂解活性。因此,细胞裂解活性与白血病的CD33表达水平直接相关。此外,阴性对照GFP构建体LTG1398和NT(来自同一供体的未经转导的T细胞)没有细胞裂解作用,表明细胞毒性是CART依赖性的。值得注意的是,LTG1905 CAR构建体在HL-60 luc细胞系中不是细胞裂解的,而在K562-luc细胞系中仅具有弱细胞裂解。

[0357] 同样地,构建体LTG1906响应于CD33高度阳性的肿瘤系THP-1和HL-60产生高水平的IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 和IL-2,而当用表达低水平的CD33抗原的白血病细胞系K562或Reh攻击时,CAR T分泌的细胞因子仍处于低水平(图5)。有趣的是,构建体LTG1905尽管在体外杀伤CD33阳性HL-60白血病是低效的,但产生非常高水平的IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 和IL-2,如通过ELISA检测的。因此,CAR的设计和结合物的选择并非无关紧要,因为一些结合物以可溶性IgG或ScFv形式具有活性,并且能够以CAR T形式在T细胞表面表达,但是它们在杀伤CD33阳性肿瘤方面是低效的。

[0358] 相比之下,当测试ScFv抗CD33 CAR T细胞时,构建体LTG1936和LTG1939对高CD33肿瘤细胞系HL-60和MOLM-14表现出稳健的杀伤活性,而对低CD33 Reh肿瘤细胞系的活性低得多,并且对低CD33 K562细胞几乎不可检测(图7)。令人惊讶并出乎意料的是,CAR构建体LTG 1937和LTG1938在裂解CD33阳性肿瘤靶标方面是低效的。这再次证明基于抗体片段的CAR T构建体的设计并非无关紧要,因为可溶性抗体结合性质和/或溶解性和/或多聚性质等可能不会直接转化为CAR功能。与仅VH的构建体1906相似,基于scFv的构建体1936、1939和基于My96 scFv的比较物构建体1940在用高CD33<sup>+</sup>肿瘤细胞系HL-60和MOLM14攻击时,都产生高水平的IFN  $\gamma$ 和TNF $\alpha$ ,但是在CD33<sup>低</sup>细胞系Reh的存在下或者当在靶细胞不存在的情

况下单独孵育CAR T细胞时,几乎没有细胞因子诱导。已经显示差的体外杀伤功能的CAR构建体1937、1938在响应于肿瘤细胞时的细胞因子产生也是低效的(数据未示出)。与MOLM14和HL60的细胞因子诱导相比,MOLM14表现出更高的CD33抗原密度(MOLM14中每个细胞30,000个位点相比于HL-60中每个细胞25,000个位点,数据未示出),这对应于对于测试的所有抗CD33构建体,由MOLM14引起的更大的IFN  $\gamma$  和TNF $\alpha$ 诱导。同样,这证明了抗CD33 CAR活化的抗原特异性质。出乎意料的是,IL-2的诱导对于CAR构建体1906和1940是强烈的,但对于CAR构建体1936和1939是中等的。

[0359] 然后,通过将并入了不同构建体的CAR T细胞在培养物中与HL-60 CD33<sup>+</sup>肿瘤细胞以5:1至0.04:1的E:T比下组合来进行长期共孵育测定。将未经转导的T细胞UTD、GFP转导的T细胞1398和E:t 0.1的单独T细胞用作测定对照。将细胞共培养5天(数据未示出)或11天,对于每种CAR构建体,这两天均表现出HL-60消除的类似趋势(图9)。在阴性对照组(UTD和1398)中,肿瘤细胞长得快并且T细胞消失,表明细胞裂解活性和延长的CAR T的生存需要CAR介导的T细胞刺激。在过夜体外测定中表现差的CAR构建体1398、1398在此长期测定中在HL-60杀伤中是无效的,并且与阴性对照组的表现相似,在等于或低于1:1的所有E:T比下CAR T细胞从培养物中消失并且肿瘤持续存在。相比之下,抗CD33 CAR构建体1906、1936和1939在CTL功能方面与比较物构建体1940具有同等效力,并在低至0.2:1的E:T比下成功消除HL-60肿瘤细胞(图9)。因此,选择构建体1906、1936、1939和1940用于在AML体内模型中进一步评估。

[0360] 为了促进体内抗CD33-CAR构建体的比较,如材料和方法中所述使用了异种移植小鼠模型。简单地说,在第0天向NSG小鼠接种稳定表达萤火虫萤光素酶和GFP的MOLM-14细胞,并在研究第5天施用每只小鼠500万个CAR T细胞。在研究第14、21、28、35天通过IVIS生物发光成像测量肿瘤生长动力学,并且在研究第19天评估小鼠血液中的CAR T功能。

[0361] 如图10A所示,移植MOLM-14肿瘤并且未经治疗(TA)或施用未经转导的T细胞对照(UTD)的小鼠到研究第14天时死于疾病。CAR构建体1936和1939表现出部分疗效并且延缓了肿瘤的生长并延长了存活。引人注目的,CAR构建体1906和比较物构建体1940介导了MOLM-14肿瘤排斥,并且这些组中的所有动物存活到了第39天的研究结束(图10A和10B)。

[0362] 在研究第19天从每只动物采血,以评估每个处理组的血液中CAR T细胞水平、血液中MOLM-14肿瘤细胞水平以及CAR T分泌的血液细胞因子水平。通过流式细胞术测量血液样品中的绝对CAR T和肿瘤细胞数目(图11A,左图)。尽管每组中CAR T细胞的数目没有显著差异,但表达CAR T细胞的构建体1906倾向于高于其他组,其次是CAR比较物构建体1940。有趣的是,在包含未经转导的T细胞的UTD对照组中T细胞水平也较高,可能是由于该组最初输注的大量细胞( $8.0 \times 10^6$ 个细胞/小鼠)。值得注意的是,与UTD对照相比,我们在所有CAR T组中均检测到了循环血MOLM-14肿瘤细胞数目的统计学显著减少(图11A,右图)。此外,当将CAR T组彼此比较时,CAR 1906和1940刺激MOLM-14细胞的最强烈减少,其显著高于CAR 1936和1939。因此,CAR 1906和1940在控制血液MOLM-14水平中最有效,其次是CAR 1936和CAR1939。

[0363] 在用CAR T细胞或UTD对照给药的小鼠中检测到可测量水平的炎性细胞因子GM-CSF、IFN  $\gamma$  和IL-2。尽管这些细胞因子的水平之间的差异不显著,但构建体1906的血浆GM-CSF和IFN  $\gamma$  水平趋于更高,而CAR1906以及CAR构建体1940和1936的IL-2水平趋于升高(图

11B)。这些结果突出了活化的CAR T细胞的提高的炎性细胞因子分泌。在实验组之间未检测到显著差异,可能是因为研究第19天CAR T细胞可能已经超过最大活化(值得注意的是,在早至研究第14天检测到了肿瘤负荷差异,图10A),然而,在肿瘤排斥中最有效的CAR 1906和1940也倾向于分泌较高水平的细胞因子。

[0364] 总之,在体外和体内证实了新的完全人抗CD33 CAR构建体LTG1906的高功能,以及构建体LTG1936和LTG1939的部分功能(下文表2)。可以想象,通过重新设计CAR间隔区、接头或共刺激结构域以允许更好地接近其所靶向的特异性表位或提高对肿瘤表位结合的CAR应答水平,可以进一步改善构建体LTG1936和LTG1939的功能。尽管通过流式细胞术具有可检测的表面表达和高细胞因子分泌,但是基于VH的抗CD33 CAR构建体LTG1905具有低的细胞裂解作用。尽管具有高表达,但是基于ScFv的CAR T构建体LTG1937和LTG1938在体外裂解靶细胞系方面也是低效的。

[0365] 实施例3.通过改变表达完全人仅重链或基于ScFv的结合序列的抗CD33 CAR的结构,可以实现CD33 CAR部分的改善的功能特性

[0366] 在该实施例中,描述了来源于新的完全人免疫球蛋白仅重链或scFv结合物序列的抗CD33 CAR T细胞的不同结构构型。

[0367] 当用表达抗原的肿瘤细胞攻击时,例如通过并入与活化结构域(例如CD3 $\zeta$ )在框内的单CD28来源vs CD137/4-1BB来源的共刺激结构域(第2代CAR)、缺少共刺激结构域(第1代CAR)的CAR结构或并入多个串联的共刺激结构域(第3代CAR),假设CART细胞分泌更高或更低水平的炎性细胞因子,例如IL-2、IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 。

[0368] 在一些构建体中,并入新的铰链和跨膜结构域(例如来源于人TNFRSF19序列的结构域)可以使CAR在肿瘤细胞杀伤和细胞因子应答中具有增强的效力。

[0369] 另外,通过改变CAR铰链(又称为接头结构域)的长度和组成,例如通过用可变长度的TNFRSF19衍生的结构域或衍生自免疫球蛋白恒定区和/或铰链的结构域取代CD8 $\alpha$ 衍生的接头结构域,例如并入免疫球蛋白分子的CH2和/或CH3和/或铰链结构域的IgG1衍生的接头结构域或IgG4衍生的接头结构域或它们的修饰,可以使肿瘤抗原更好地接近CAR结合结构域。这是由于以下事实:CAR铰链/接头结构域的适当长度和柔性对于最佳可及性,与肿瘤抗原的结合以及CAR T细胞活化是必需的。

[0370] 此外,在CAR T细胞表面表达的CAR构建体序列中并入标签分子可用于1)在制造过程中以及在临床应用中通过流式细胞术鉴定CAR T细胞,2)在制造过程中对CAR T细胞进行分选/分离,3)在CAR相关的毒性,例如响应于抗CD19 CAR的B细胞发育不全、细胞因子释放综合征或CAR相关的神经毒性的情况下,作为自杀标签以消除来自患者身体的CAR T细胞。为此目的,CAR构建体序列可以包含天然跨膜蛋白(例如HER1/EGFR、HER2/Neu/erbB-2、NGFR/LNGFR/CD271、CD19、CD20或其他蛋白质)的截短的胞外域和跨膜部分。也可以使用这些或其他序列的模拟表位。通过施用具有标签反应性的临床级抗体,例如靶向EGFR(西妥昔单抗)、HER2(曲妥珠单抗)、CD20(利妥昔单抗)或其他蛋白质的抗体,实现从患者的循环中去除标记的CAR T细胞。

[0371] 图12A-12F分别示出了上述CAR构型的选择实例。使用来源于免疫球蛋白VH结构域CD33\_4的CD33结合序列设计了所描述的抗CD33 CAR构建体,但是,也可以使用ScFv形式的结合物序列。



[0372] 材料和方法:

[0373] (a) 嵌合抗原受体 (CAR)-表达载体的建立

[0374] CAR抗原结合结构域序列来源于人抗CD33 ScFv或重链可变片段。通过将结合物序列与CD8a连接和跨膜结构域 (UniProt序列ID P01732, aa 138-206), 然后与4-1BB (CD137, aa 214-255, UniProt序列ID Q07011) 信号转导结构域和CD3 $\zeta$ 信号转导结构域 (CD247, aa 52-163, 参考序列ID: NP\_000725.1) 框内连接来产生CAR T构建体。对于一些构建体, 使用CD28共刺激序列 (UniProt ID: P10747, 跨膜结构域, aa 153-179), 而不是4-1BB共刺激序列。在一些构建体中, 将CD8连接和/或跨膜结构域用来源于TNFRSF19蛋白 (UniProt ID: Q9NS68) 的多种长度的结构域替代。对于一些序列, 将截短的表皮生长因子受体 (tEGFR) 标签 (UniProt ID: P00533, 多种序列) 通过2A肽并入到CAR构建体中, 以能够在体外标记转导的细胞, 以及用作体内应用的自杀开关。将CAR构建体序列克隆到第三代慢病毒质粒骨架 (Lentigen Technology Inc., Gaithersburg, MD) 中。通过HEK 293T细胞的瞬时转染产生包含慢病毒载体 (LV) 的上清液, 通过离心包含慢病毒载体的上清液使载体沉淀, 并储存在-80℃。

[0375] 表2-表达和功能总结-抗CD33 CAR

[0376]

实验组	CAR 表达	细胞裂解	细胞因子水平	体内肿瘤排斥
NT 或 UTD (未经转导的对照)	未检出	无	N/A/未检出	无
LTG1398 GFP	N/A/ 未检出	无	N/A/未检出	N/A
LTG1905 CAR	检出	低	非常高	N/A

[0377]

LTG1906 CAR	检出	高	高	是
LTG1936 CAR	检出	高	高 TNFa、IFNg/低 IL-2	部分
LTG1937 CAR	检出	无	低	N/A
LTG1938 CAR	检出	无	低	N/A
LTG1939 CAR	检出	高	高 TNFa、IFNg/低 IL-2	部分
LTG1940 CAR	检出	高	高	是

[0378] 在本文中引用的每一篇申请和专利,以及在每一篇所述申请和专利中引用的每一篇文献或参考文献(包括在每一篇授权专利的审查期间;“申请引用文献”),以及与这些申请和专利中任一个相对应和/或要求其优先权的每一篇PCT和外国申请或专利,以及每一篇申请引用文献中引用或参考的每一篇文献均在此通过引用明确地并入本文,并且可以用于实施本发明。更通常地,本文中引用了数篇文献或参考文献,不管是在权利要求书之前的参考文献列表中还是在正文本身;并且,这些文献或参考文献(“本文引用参考文献”)中的每一篇以及在每一篇本文引用参考文献中引用的每一篇文献或参考文献(包括任何制造商说明书、指南等)均在此通过引用明确地并入本文。

[0379] 对一些具体实施方案的前述描述提供了充分的信息使得其他人员可以通过应用目前知识针对不同应用容易地对这样的具体实施方案进行修改或调整而不脱离一般概念,并且因此这样的调整和修改应当且旨在包含在所公开实施方案的等同方案的含义和范围内。应理解的是,本文所使用的短语或术语是出于描述而非限制的目的。在附图和说明书中已经公开了示例性实施方案,并且尽管可能已经使用特定的术语,但是除非另作声明,否则其仅以一般性的描述性含义使用,而非出于限制目的,权利要求书的范围因此并不局限于此。此外,本领域技术人员将理解,本文所讨论方法的某些步骤可以以可替换顺序来排序或步骤可以进行组合。因此,这意味着所附权利要求书并不限于本文所公开的具体实施方案。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验就可确定本文所述的本发明实施方案的许多等同方案。这样的等同方案涵盖在以下权利要求书中。

[0380] 序列表的引用

[0381] 本申请包含通过名为“序列表”的PDF文件以电子方式提交给美国专利及商标局(United States Patent and Trademark Office)的序列表,该序列表通过引用并入。

[0382] 本公开内容的序列

[0383] 使用37 C.F.R.1.822中定义的核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码示出了下面列出的核酸和氨基酸序列。示出了每个核酸序列的仅一条链,但是互补链应理解为通过对所示出的链的任何参考而被包括在内。在所附的序列表中:

[0384] SEQ ID NO:1 CD33反应性免疫球蛋白重链可变结构域(VH-2)的核苷酸序列

gagggtgcagctggaggagctctggggaggccttggtacagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctt  
cagtagctatggcatgagctgggtccgccaggctccaaggaagggcctggagtggtggggaatcaatcatagtgaagcaccaactac  
[0385] aaccgcctcctcaagagtcgagtcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca  
cagccacgtattactgtgcgagaccctcaactactactactacatggacgtctggggcaaaggaccacggtcacctctcctca

[0386] SEQ ID NO:2 CD33反应性免疫球蛋白重链可变结构域(VH-2)的氨基酸序列

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y  
G M S W V R Q A P R K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R  
[0387] V T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A T Y Y C A R P L N  
Y Y Y Y Y M D V W G K G T T V T V S S

[0388] SEQ ID NO:3 CD33反应性免疫球蛋白重链可变结构域(VH-4)的核苷酸序列

- [0389] gaggtgcagctgggtggagtctggggaggcttggtacagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctt  
cagtagctatggcatgagctgggtccgccaggctccaagacaagggcttgagtgggtggccaacataaagcaagatggaagtgagaata  
ctatgcggactcagtgaagggccgattcacatctccagagacaattccaagaacacgcgtgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagg  
acacagccacgtattactgtgcgaaagaaaatgtggactggggccaggggcaccttggtcaccgtctcctca
- [0390] SEQ ID NO:4 CD33反应性免疫球蛋白重链可变结构域(VH-4)的氨基酸序列
- [0391] E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y  
G M S W V R Q A P R Q G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y A D S V K  
G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A T Y Y C A K E  
N V D W G Q G T L V T V S S
- [0392] SEQ ID NO:5 CD33反应性ScFv 9结合结构域的核苷酸序列
- cagggtgcagctgggtgcaatctggggcagaggtgaaaaagccggggagctctgaggatctcctgtaagggttctggattcagtttccacc  
tactggatcggtgggtgcgccagatcccgggaaaggcctggagtggatggggatcatctatcctgggtgactctgataccagatacagccc  
gtcctccaaggccaggtcacatctcagccgacaagtcacagcaccgcctacctgcagtggagcagcctgaaggcctcgacaccgcc  
atgtattactgtgcgagactagttggagatggctacaatacggggcttttgatactggggccaagggaacaatggtcaccgtctcttcaggag  
gtggcggtctggtgggtggcgtagcggtgggtggcgatccgataattgtatgaccacactccactctctgtccgtcacccttgacagc  
cgccctccatctcctgcaagtctagtcagagcctcctgcatagtaattgaaagacctaattgtattgtacctgcagaagccaggccagcctcc  
acagctcctgatctatggagctccaaccgggtctctggagtccagacaggttcagtggcagcggtcagggacagattcacactgaaaaat  
cagccgggtggaggctgaggatgtgggtttattactgcatgcaagatacagcttctatcaccttcGgccaagggaacagactggagat  
taaa
- [0393] SEQ ID NO:6 CD33反应性ScFv 9结合结构域的氨基酸序列
- [0394] Q V Q L V Q S G A E V K K P G E S L R I S C K G S G F S F P T Y  
W I G W V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G  
Q V T I S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R L V  
G D G Y N T G A F D I W G Q G T M V T V S S G G G G S G G G G S G  
[0395] G G G S D I V M T H T P L S L S V T P G Q P A S I S C K S S Q S L L H  
S N G K T Y L Y W Y L Q K P G Q P P Q L L I Y G A S N R F S G V P D  
R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C M Q S I Q L P  
I T F G Q G T R L E I K
- [0396] SEQ ID NO:7 CD33反应性ScFv 10结合结构域的核苷酸序列
- caggtagcagctgcagcagtcagggtccaggactggtagaagccctgcagaccctctcactcacctgtgccatctccgggacagtgctcttag  
caacactgctgcttggaactggatcaggcagtcctccatcgagaggccttgagtggctgggaaggacatactacaggtccaagtggat  
aatgattatgcagtcctgtgaaaagtcgaataacatcaaccagacacatccaagaaccagttctccctgcagctgaactctgtgactccc  
aggacacggctgtgtattactgtgcaagagaacgtattactatgggtcggggagtattgggatgcttttgatatctggggccaagggaacc  
ggtcaccgtctcctcaggaggtggcggtctggttagtggcggtagcggtgggtggcgatcccagtcgtctgtacgcagccgcctcagtg  
[0397] tctgcggcccccaggacagaaggtcacatctcctgctctggaagcagctccaacattgggaataaattgtatcctgggtaccagcagctccca  
ggcacggccccaaactcttcatctataaaaaataatcagcggccctcagaggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcct  
ccctggccatcagtggtgctccagctgacgatgaggctgactactactgtgcagcatgggatgacaggctgaatggatatgtcttcggaactg  
ggaccaagggtcaccgtccta
- [0398] SEQ ID NO:8 CD33反应性ScFv 10结合结构域的氨基酸序列

[0399]

[0400]

[0401]

[0402]

[0403]

[0404]

[0405]

[0406]

[0407] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS  
YWIGWVRQMPEGKLEWMGIIYPGDS DTRYSPSF  
QGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCAR  
LTTAGGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGG  
GSEIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSD  
GNTYLSWLHQRPGQPPRLLMYKISNRFSGVTD RF  
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLPL  
TFGGGT KLEIK

[0408] SEQ ID NO:13前导/信号肽序列的核苷酸序列

[0409] **atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcggtttctgctgattccg**

[0410] SEQ ID NO:14前导/信号肽序列的氨基酸序列

[0411] **MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP**

[0412] SEQ ID NO:15 LTG 1905\_ (EF1a-VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG  
AGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATG  
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCAT  
AGTGAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATCTCCAGAGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCC  
ACGTATTACTGTGCGAGACCCCTCAACTACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCA  
AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGC  
CGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTG  
CCGCCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATAT  
[0413] CTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATC  
ACCCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTT  
ATGCGGCCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAG  
GAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCC  
GCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGA  
GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAAC  
CACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATG  
GCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCA  
CGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCA  
TATGCAAGCACTCCCACCCCGG

[0414] SEQ ID NO:16 LTG 1905\_ (EF1a-VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMS  
WVRQAPRKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYY  
CARPLNYYYYYMDVWVGKTTVTVSSAAATTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG  
[0415] GAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ  
EEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRG  
RDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT  
KDTYDALHMQALPPR

[0416] SEQ ID NO:17 LTG 1906 (EF1a-VH-4 CD33-CD8 TM-41BB-CD3ζ) 核酸序列的核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG  
AGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATG  
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCA  
AGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG  
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC  
AGCCACGTATTACTGTGCGAAAGAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAC  
CGTCTCCTCAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCA  
ACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGGT  
[0417] GGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGC  
TGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATACCCCTTACTGCAAGAG  
GGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAGAC  
GACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGAT  
GCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCC  
AGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTG  
GACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCC  
TCAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAG  
AAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAG  
GGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTG CATATGCAAGCACTCCCA  
CCCCGG

[0418] SEQ ID NO:18 LTG 1906 (EF1a-VH-4 CD33-CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMS  
WVRQAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAT  
YYCAKENVDWQGQTLVTVSSAAATTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT  
[0419] RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD  
ALHMQALPPR

[0420] SEQ ID NO:19 LTG 1936\_ (EF1a\_ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζCAR) 的核苷酸序列

[0421]

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCAGAGGTGAAAAAGCCCGG  
GGAGTCTCTGAGGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATTAGTTTTCCACCTACTGGATC  
GGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCT  
GGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCC  
GACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACC  
GCCATGTATTACTGTGCGAGACTAGTTGGAGATGGCTACAATACGGGGGGCTTTTGAT  
ATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGT  
GGCGGTAGCGGTGGTGGCGGATCCGATATTGTGATGACCCACACTCCACTCTCTCTGT  
CCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCA  
TAGTAATGGAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACA  
GCTCCTGATCTATGGAGCTTCCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGACAGGTTCAGTGGC  
AGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTT  
GGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAGCTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACAC  
GACTGGAGATTAAAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTCGGCCGCCGACTCCGG  
CCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGC  
GGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGC  
CCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCTTTACTGC  
AAGAGGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTG  
CAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGG

[0422]

GGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACA  
GGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACG  
TGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAA  
AACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTA  
CTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGT  
ACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCCATATGCAAGCAC  
TCCCACCCCGG

[0423]

SEQ ID NO:20 LTG 1936\_ (EF1a\_ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的氨基酸序列  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGFSFPTYWIGWVRQ  
MPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARL  
VGDGYNTGAFDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTH TPLSLSVTPGQPASI  
SCKSSQSLLHSNGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYGASNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR  
VEAEDVG VYYCMQSIQLPITFGQGRLEIKAAATTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP  
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ  
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DK  
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS  
TATKDTYDALHMQALPPR

[0424]

SEQ ID NO:21 LTG 1937\_ (EF1a\_ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζCAR) 的核苷酸

序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTC  
GCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCCTAGCAAACTGCT  
GCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACA  
TACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTCCCTGTGAAAAGTCGAATAACC  
[0425] ATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCG  
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAAACGTATTACTATGGTTCCGGGGAGTT  
ATTGGGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGAG  
GTGGCGGGTCTGGTAGTGGCGGTAGCGGTGGTGGCGGATCCCAGTCTGTCGTGACGC  
AGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAA  
GCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGCACGG  
CCCCAAACTCTTCATCTATAAAAATAATCAGCGGCCCTCAGAGGTCCCTGACCGATT  
CTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAC  
GATGAGGCTGACTACTACTGTGCAGCATGGGATGACAGGCTGAATGGATATGTCTTC  
GGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGG  
CCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTT  
GCCGCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATA  
TCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCAT  
[0426] CACCCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTT  
CATGCGGCCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGA  
GGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCC  
CGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAG  
AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAA  
CCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGAT  
GGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTC  
ACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGC  
ATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

[0427] SEQ ID NO:22 LTG 1937\_ (EF1a\_ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的氨基酸序列  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNTAA  
WNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDYAVPVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT  
AVYYCARETYYYGSGSYWDAFDIWGQGTTVTVSSGGGGSGSGSGSGSGGSQSVVTQPPS  
VSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLFYKNNQRPSEVPDRFSGSKSGT  
[0428] SASLAISGLQSDDEADYYCAAWDDRLNGYVFGTGTKVTVLAAATTPAPRPPTPAPTAS  
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL  
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG  
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0429] SEQ ID NO:23 LTG 1938\_ (EF1a\_ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的核苷酸序列



- ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTC  
GCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCT  
GCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAGGGACA  
TACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAATT  
ATCAACGCAGACACATCGAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCC  
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGATATTACTATGATAGTACCGACTGG  
TTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGCGGGTCT  
GGTGGTGGCGGTAGCGGTGGTGGCGGATCCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCAACT  
GTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGA  
AGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTATC  
TATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCA  
GGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTAT  
[0430] TACTGTTCTTCCCGGACGGCAGTGGTCATCCATATCTCTTCGGACCTGGGACCAAGG  
TCACCGTTCTTGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCC  
AACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGG  
TGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCG  
CTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATACCCTTTACTGCAAGA  
GGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAGA  
CGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCGAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGA  
TGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGC  
CAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCT  
GGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAAC  
CCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTC  
AGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACC  
AGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCC  
CACCCCGG
- [0431] SEQ ID NO:24 LTG 1938\_ (EF1a\_ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的氨基酸序列  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAA  
WNWIRQSPSRGLEWLGGTYYSKWKYNDYAVSVKSRIINADTSKNQFSLQLNSVTPEDT  
AVYYCARGYYYDSTDWFDWPWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGSSSELTQDPTVSVA  
LGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTI
- [0432] TGAQAEDEADYYCSSRDGSGHPYLFPGTKVTVLAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP  
EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF  
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
DVLDKRRGRDPGMPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL  
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0433] SEQ ID NO:25 LTG 1939\_ (EF1a\_ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的核苷酸序列

- ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGGAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGG  
GGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATC  
GGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCT  
GGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCC  
GACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACC  
GCCATGTATTACTGTGCGAGACTGACTACGGCTGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAA  
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGTGGCGGTAGCGGT  
GGTGGCGGATCCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTG  
GACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAA  
ACACCTACTTGAGTTGGCTTCACCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATGT  
ATAAGATTTCTAACC GGTTCTCTGGGGTACACAGACAGATTCAGTGGCAGCGGGTACG  
GGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT  
ACTGCATGCAAGGTATACACCTACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGA  
TCAAAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCA  
TCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGGTGGAG  
CCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGC  
CGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGC  
CGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACT  
CAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGA  
ACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAA  
TCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACA  
AGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAG  
GAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAAT  
CGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGA  
CTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCC  
CGG
- [0434]
- [0435]
- [0436] SEQ ID NO:26 LTG 1939\_ (EF1a\_ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζ) 的氨基酸序列  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG  
WVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY  
YCARLTTAGGMDVWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPLSLPVTLGQPAS  
ISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLHQRPGQPPRLLMYKISNRFSGVTDRFSGSGSGTDFTLKIS
- [0437] RVEAEDVG VYYCMQGIHLPLTFGGG TKLEIKAAATTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC  
RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRP  
VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG  
LSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0438] SEQ ID NO:27 DNA CD8跨膜结构域的核苷酸序列

- [0439] **atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctctgtc actgggtatc accctttact gc**
- [0440] SEQ ID NO:28 CD8跨膜结构域的氨基酸序列  
**Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu**
- [0441] **Val Ile Thr Leu Tyr Cys**
- [0442] SEQ ID NO:29 DNA CD8铰链结构域的核苷酸序列  
**accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccacgcgctc gcagcccctg**
- [0443] **tcctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg**  
**gacttcgcct gtgat**
- [0444] SEQ ID NO:30 CD8铰链结构域的氨基酸序列  
**Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala**
- [0445] **Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly**  
**Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr**
- [0446] SEQ ID NO:31 CD8 $\alpha$  (NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3) 的第118至178号氨基酸铰链区的氨基酸序列  
**Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met**
- [0447] **Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe**  
**Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu**
- [0448] SEQ ID NO:32人IgG CL序列的氨基酸序列  
**Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser**  
**Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp**  
**Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro**
- [0449] **Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn**  
**Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys**  
**Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val**  
**Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser**
- [0450] SEQ ID NO:33 4-1BB DNA信号转导结构域的核苷酸序列  
**aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa**
- [0451] **actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgattccag aagaagaaga aggaggatgt**  
**gaactg**
- [0452] SEQ ID NO:34 4-1BB信号转导结构域的氨基酸序列

- Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 [0453] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
- [0454] SEQ ID NO:35 CD3 $\zeta$ DNA信号转导结构域的核苷酸序列  
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggccca gaaccagctc  
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg tttggacaa gagacgtggc  
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat  
 [0455] gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc  
 cggagggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc  
 tacgacgccc ttacatgca ggcctgccc cctcgc
- [0456] SEQ ID NO:36 CD3 $\zeta$ 的氨基酸序列  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 [0457] Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
- [0458] SEQ ID NO:37 Scvf cd 19的核苷酸序列  
 gacatccaga tgacacagac tacatctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacatcagttgca gggcaagtca  
 ggacattagt aatatattaa attggtatca gcagaacca gatggaactg ttaaactcct gatctacat acatcaagat tacactcagg  
 agtcccatca aggttcagt gcaagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg ccacttactt  
 ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gtccggagg gggaccaagc tggagatcac aggtggcggg ggctcgggcg  
 [0459] gtggtgggtc ggggtggcggc ggatctgagg tgaaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg  
 tccgtcacat gcactgtctc aggggtctca ttacccgact atggtgtaag ctggattcgc cagcctccac gaaagggtct  
 ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac tataattcag ctctcaaac cagactgacc atcatcaagg  
 acaactccaa gagccaagtt ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca ttactactg tgccaacat tattactacg  
 gtggtagcta tgctatggac tactggggcc aaggaacctc agtcaccgtc tectca
- [0460] SEQ ID NO:38 Scvf cd 19的氨基酸序列

- Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile  
Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val  
Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln  
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser 100  
[0461] 105 110 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val  
Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr  
Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly  
Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
- [0462] SEQ ID NO:39 GMCSF前导肽的核苷酸序列
- [0463] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCCG
- [0464] SEQ ID NO:40 GMCSF前导肽的氨基酸序列
- [0465] **MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP**
- [0466] SEQ ID NO:41 TNFRSF19前导肽的核苷酸序列
- [0467] GGCTCTGAAAGTGCTGTTGGAACAAGAAAAGACCTTCTTACCTTGCTCGTGTTGCTGGG  
GTACCTGTCTGCAAAGTCACCTGT
- [0468] SEQ ID NO:42 TNFRSF19前导肽的氨基酸序列
- [0469] **MALKVLEQEKTFFTLLVLLGYLSCKVTC**
- [0470] SEQ ID NO:43 CD8 $\alpha$ 前导肽的核苷酸序列
- [0471] atggcgctgccggtgaccgcgctgctgctgccgctggcgctgctgctgcatgcggcgcgccg
- [0472] SEQ ID NO:44 CD8 $\alpha$ 前导肽的氨基酸序列
- [0473] **MALPVTALLPLALLHAARP**
- [0474] SEQ ID NO:45 CD28共刺激结构域的核苷酸序列
- [0475] CGGTCTGAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCGACTACATGAACATGACTCC  
TAGAAGGCCCGGACCCACTAGAAAGCACTACCAGCCGTACGCCCTCCTC  
GGGATTTCGCCGCATACCGG TCC
- [0476] SEQ ID NO:46 CD28共刺激结构域的氨基酸序列
- [0477] **RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS**
- [0478] SEQ ID NO:47 CD3 $\zeta$ 活化结构域的的核苷酸序列
- [0479] AGAGTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGACA  
GAACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCGGCGGGAAGAATATGAC  
GTGCTGGACAAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGA  
GGAGGAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAAGTGCAGAAGGACAA  
GATGGCGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGGAGA  
GGGAAGGGTCATGACGGACTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCCACTAAGGA  
CACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGG
- [0480] SEQ ID NO:48 CD3 $\zeta$ 活化结构域的的氨基酸序列

- [0481] **RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR  
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  
YDALHMQALPPR**
- [0482] SEQ ID NO:49 TNFRSF19铰链和跨膜结构域的核苷酸序列(跨膜结构域带下划线)  
**GCGGCCGCGGTTCGGATTCCAAGACATGGAATGCGTGCCCTGCGGCGACCCGCCACCTCCT**
- [0483] **TACGAGCCGCACTGCGCATCGAAGGTCAACCTCGTGAAGATCGCGAGCACCGCGTCCTCA  
CCCCGGGATACTGCTCTG GCCGCCGTGATTTGTTCCGCCTTGGCCACCGTGCTTCTGGCC  
CTGCTGATCCTCTGTGTGATC**
- [0484] SEQ ID NO:50 TNFRSF19铰链和跨膜结构域的氨基酸序列(跨膜结构域带下划线)  
**AAAVGFQDMECVPCGDPPPPYEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTA**
- [0485] **L AAVICSALATVLLALLILCVI**
- [0486] SEQ ID NO:51 TNFRSF19跨膜结构域的核苷酸序列  
**GCCGCCGTGATTTGTTCCGCCTTGGCCACCGTGCTTCTGGCCCTGCTGATCCTCTGTGTG**
- [0487] **ATC**
- [0488] SEQ ID NO:52 TNFRSF 19跨膜结构域的氨基酸序列  
**AAVICSALATVLLALLILCVI**
- [0489] **AAVICSALATVLLALLILCVI**
- [0490] SEQ ID NO:53 TNFRSF19铰链结构域的核苷酸序列  
**GCGGCCGCGGTTCGGATTCCAAGACATGGAATGCGTGCCCTGCGGCGACCCGCCACCTCCT**
- [0491] **TACGAGCCGCACTGCGCATCGAAGGTCAACCTCGTGAAGATCGCGAGCACCGCGTCCTCA  
CCCCGGGATACTGCTCTG**
- [0492] SEQ ID NO:54 TNFRSF 19铰链结构域的氨基酸序列  
**AAAVGFQDMECVPCGDPPPPYEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTAL**
- [0493] **AAAVGFQDMECVPCGDPPPPYEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTAL**
- [0494] SEQ ID NO:55截短的TNFRSF19铰链结构域的核苷酸序列  
**TACGAGCCTCACTGCGCCAGCAAAGTCAACTTGGTGAAGATCGCGAGCACTGCCTCGTCC**
- [0495] **CCTCGGGACACTGCTCTGGC**
- [0496] SEQ ID NO:56截短的TNFRSF19铰链结构域的氨基酸序列  
**YEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTAL**
- [0497] **YEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTAL**
- [0498] SEQ ID NO:57与TNFRSF19跨膜结构域融合的CD8a铰链结构域的核苷酸序列(跨膜  
序列带下划线)  
**GCGGCCGCGCCCGCCCTCGGCCCCGACTCCTGCCCCGACGATCGTTCCCAACCTCTC**
- [0499] **TCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGCCCCGCCGCGGTGGCGCTGTCCACACTCGCGGACTG  
GACTTTGATACCGCACTG GCGGCCGTGATCTGTAGCGCCCTGGCCACCGTGCTGCTGGCG  
CTGCTCATCCTTTGCGTGATCTACTGCAAGCGGCAGCCTAGG**
- [0500] SEQ ID NO:58与TNFRSF19跨膜结构域融合的CD8a铰链结构域的氨基酸序列(跨膜  
序列带下划线)  
**AAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV**
- [0501] **HTRGLDFDTALA AAVICSALATVLLALLILCVIYCK  
RQPR**
- [0502] SEQ ID NO:59 CD28共刺激结构域的核苷酸序列  
**CGGTCGAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCGACTACATGAACATGACTCCTAGAAGGCCC**
- [0503] **GGACCCACTAGAAAGCACTACCAGCCGTACGCCCTCCTCGGGATTTCGCCGCATACCGG  
TCC**
- [0504] SEQ ID NO:60 CD28共刺激结构域的氨基酸序列  
**RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS**
- [0505] **RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS**
- [0506] SEQ ID NO:61 CD3ζ形式2的核苷酸序列

- [0507] cgcgtgaaat ttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctg  
tataacgaactgaacctgggcccgcggaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggc  
cgcgatccggaaatgggcccgaaccgcgcgcgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataac  
gaactgcagaaagataaaatggcgggaagcgtatagcgaattggcatgaaaggcgaacgc  
cgccgcggcgaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaagataacc  
tatgatgcgctgcatatgcaggcgcctgccgcgcgc
- [0508] SEQ ID NO:62 CD3 $\zeta$ 形式2的氨基酸序列
- [0509] R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R  
E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L  
Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D  
G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R
- [0510] SEQ ID NO:63 弗林蛋白酶P2A弗林蛋白酶的核苷酸序列
- [0511] CGCGCGAAACGCAGCGGCAGCGGCGCGACCAACTTTAGCCTGCTGAAAC  
AGGCGGGCGAT GTGGAAGAAAACCCGGGCCCGCGAGCAAAGAGG
- [0512] SEQ ID NO:64 弗林蛋白酶P2A弗林蛋白酶的氨基酸序列 (弗林蛋白酶序列带下划线)
- [0513] RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRAKR
- [0514] SEQ ID NO:65 弗林蛋白酶T2A的核苷酸序列
- [0515] AGAGCTAAACGCTCTGGGTCTGGTGAAGGACGAGGTAGCCTTCTTACGTG  
CGGAGACGTGGAGGAAAACCCAGGACCC
- [0516] SEQ ID NO:66 弗林蛋白酶T2A的氨基酸序列 (弗林蛋白酶序列带下划线)
- [0517] RAKRSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
- [0518] SEQ ID NO:67 截短的EGFR (tEGFR) 标签的核苷酸序列
- AGGAAGGTTTGCAATGGAATCGGTATAGGGGAGTTTAAGGATTCACTTAGCATAAACGCT  
ACTAATATTAAACACTTCAAAAACCTGTACGAGTATAAGTGGAGATCTTCACATTTTGCCG  
GTTGCATTCCGAGGCGATTCAATCACCCACACGCCACCGCTTGACCCACAAGAATTGGAT  
ATTCTTAAACCGTTAAAGAAATAACGGGGTTTTTGTCTATTCAAGCGTGGCCAGAAAAT  
CGCACTGACCTCCATGCTTTCGAGAACCTGGAGATTATAAGAGGACGAACCTAAGCAGCAT  
GGTCAATTCTCCCTTGCTGTGGTCAGCCTGAACATCACCAGTCTTGGTTTGCGGTCCCTC  
AAGGAAATTTAGATGGAGATGTCATCATAAGCGGCAACAAGAATTTGTGCTATGCAAAT  
ACCATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGCACTTCCGGCCAGAAAACCAAGATTATTTCAAAT  
CGGGGTGAGAACAGCTGCAAAGCCACCGGCCAGGTTTGTCTATGCCTTGTGCTCTCCGGAA  
GGCTGTTGGGGGCCAGAACCCAGGGACTGCGTCAGTTGCAGAAACGTCTCAAGAGGCCCGC  
GAATGCGTTGACAAGTGTAACCTCCTTGAGGGTGAGCCACGAGAGTTTGTGAGAACAGC  
GAGTGTATACAATGTCACCCTGAATGTTTGGCCAGGCTATGAATATAACCTGCACAGGC  
CGCGGGCCTGATAACTGCATCCAGTGTGCTCATTACATAGATGGACCTCACTGTGTGAAA  
ACCTGCCCAGCGGAGTTATGGGAGAAAACAACACTCTGGTGTGGAAATACGCTGATGCA  
GGCCACGTGTGCCACCTTTGTACCCGAATTGTACATATGGGTGTACCGGTCCTGGACTT  
GAAGTTGCCCTACCAATGGCCCTAAAATACCCAGTATCGCAACTGGCATGGTAGGCGCT  
CTTCTCTTGCTCTTGGTAGTTGCTCTCGGCATAGGTCTTTTATG
- [0519]
- [0520] SEQ ID NO:68 截短的EGFR (tEGFR) 标签的氨基酸序列
- RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHLPLVAFRGDSFTHTPPLDPQELD  
ILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHQQFSLAVVSLNITSLGLRSL  
KEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPE  
GCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTG  
RGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGL  
EGCPTNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM
- [0521]
- [0522] SEQ ID NO:69 LTG1927 (EF1a-CD33<sub>4</sub>-CD8 TM-CD28-CD3 $\zeta$ -cfrag) 的核苷酸序列

- [0523] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGC  
CAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA  
TACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAA  
GAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCGACTACC  
ACTCCTGCACCACGGCCACCTACCCAGCCCCCACCATTGCAAGCCAGCCACTTTCCTG  
CGCCCCGAAGCGTGTAGACCAGCTGCTGGAGGAGCCGTGCATACCCGAGGGCTGGACTTC  
GCCTGTGACATCTACATCTGGGCCCCATTGGCTGGAACCTGCGGCGTGCTGCTCTTGTCT  
CTGGTCATTACCCTGTACTGCCGGTCAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCGACTACATG  
[0524] AACATGACTCCTAGAAGGCCCCGAGCCACTAGAAAGCACTACCAGCCGTACGCCCCCTCT  
CGGGATTTCGCCGCATACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCC  
TACCAGCAGGGACAGAACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTGCGCGGGAAGAATAT  
GACGTGCTGGACAAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAG  
AACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCC  
GAGATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCATGACGGAAGTGTACCAGGGC  
CTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGG
- [0525] SEQ ID NO:70 LTG1927 (Ef1a-CD33\_4-CD8 TM-CD28-CD3ζ-cfrag) 的氨基酸序列  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVR  
QAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAK  
[0526] ENVDWGQGTIVTVSSAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP  
RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRK  
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0527] SEQ ID NO:71 LTG\_D0033 (Ef1a\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28z) 核苷酸序列  
的核苷酸序列  
ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGC  
CAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA  
TACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAA  
GAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCGACTCGGA  
TTCCAAGACATGGAATGCGTGCCCTGCGGCGACCCGCCACCTCCTTACGAGCCGCACTGC  
GCATCGAAGGTCAACCTCGTGAAGATCGCGAGCACCGCGTCTCCTACCCCGGGATACTGCT  
[0528] CTGGCCGCCGTGATTTGTTCCGCCTTGCCACCGTGCTTCTGGCCCTGCTGATCCTCTGT  
GTGATCCGGTCAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCGACTACATGAACATGACTCCTAGA  
AGGCCCCGACCCACTAGAAAGCACTACCAGCCGTACGCCCCCTCCTCGGGATTTCGCCGCA  
TACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGACAG  
AACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTGCGCGGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAA  
CGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAGAACCCTCAAGAGGGC  
CTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAG  
GGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCATGACGGAAGTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCCACT  
AAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGG
- [0529] SEQ ID NO:72 LTG\_D0033 (Ef1a\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28z) 核苷酸序列  
的氨基酸序列  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVR  
QAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAK  
[0530] ENVDWGQGTIVTVSSAAAVGFQDMECVPCGDP PPPPYEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTA  
LAAVICSALATVLLALLILCVIRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA  
YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKPNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0531] SEQ ID NO:73 LTG\_D0034 (Ef1a\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_4-1BBz) 核苷酸的核  
苷酸序列



[0532]

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGC  
CAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA  
TACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAA  
GAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCACTCGGA  
TTCCAAGACATGGAATGCGTGCCCTGCGGCGACCCGCCACCTCCTTACGAGCCGCACTGC  
GCATCGAAGGTCAACCTCGTGAAGATCGCGAGCACCGCGTCCTCACCCCGGGATACTGCT  
CTGGCCGCCGTGATTTGTTCCGCCTTGGCCACCGTGCTTCTGGCCCTGCTGATCCTCTGT  
GTGATCAAGAGGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCC  
GTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGG  
GGATGCGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGA  
CAGAACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCGGCGGGAAGAATATGACGTGCTGGAC  
AAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAGAACCCTCAAGAG  
GGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATG  
AAGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCATGACGGACTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCC  
ACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGG

[0533]

列

SEQ ID NO:74 LTG\_D0034 (Ef1a\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_4-1BBz) 的氨基酸序

[0534]

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVR  
QAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTATYYCAK  
ENV DWGQGT LVT VSSAAA VGFQDMECVPCGDP PPPPYEPHCASKVNL VKIASTASSPRDTA  
LAAVICSALATVLLALLILCVIKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
GCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGKPRRKNPQE  
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0535]

SEQ ID NO:75 LTG\_D0015 (Ef1a\_CD33\_4 VH CD8 BBz T2A tEGFR) 的核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGC  
CAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA  
TACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAA  
GAAAATGTGACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACGTCTCCTCAGCGGCCGCAACTACC  
ACCCCTGCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTG  
CGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTT  
GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCG  
CTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAG  
CCGTTTATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGAGATTCCCT  
GAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCC  
GCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAG  
TACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGG  
AAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTAC  
TCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTACGACGGGCTGTACCAG  
GGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGATATGCAAGCACTCCCACCC  
CGGTCTAGAGCTAAACGCTCTGGGTCTGGTGAAGGACGAGGTAGCCTTCTTACGTGCGGA  
GACGTGGAGGAAAACCCAGGACCCCGAGCCAAACGAATGCTGCTGCTTGTACAAGCCTT  
TTGCTCTGCGAACTCCCCATCCAGCTTTTCTCCTGATTCCAAGGAAGGTTTGCAATGGA  
ATCGGTATAGGGGAGTTTAAGGATTCACCTTAGCATAAACGCTACTAATATTAACACTTC  
AAAACTGTACGAGTATAAGTGGAGATCTTCACATTTTGCCGGTTGCATTCCGAGGCGAT  
TCATTCACCCACACGCCACCGCTTGACCCACAAGAATTGGATATTCTTAAAACCGTTAAA  
GAAATAACGGGGTTTTTGCTCATTCAAGCGTGGCCAGAAAATCGCACTGACCTCCATGCT  
TTCGAGAACCTGGAGATTATAAGAGGACGAACTAAGCAGCATGGTCAATTCTCCCTTGCT  
GTGGTCAGCCTGAACATCACCACTTGGTTTGCGGTCCCTCAAGGAAATTTAGATGGA  
GATGTCATCATAAGCGGCAACAAGAATTTGTGCTATGCAAAATACCATAAACTGGAAAAAA  
CTGTTTGGCACTTCCGGCCAGAAAACCAAGATTATTTCAAATCGGGGTGAGAACAGCTGC  
AAAGCCACCGGCCAGGTTTGTATGCCTTGTGCTCTCCGGAAGGCTGTTGGGGGCCAGAA  
CCCAGGGACTGCGTCAGTTGCAGAAACGTCTCAAGAGGCCGCGAATGCGTTGACAAGTGT  
AACCTCCTTGAGGGTGAGCCACGAGAGTTTGTGAGAACAGCGAGTGTATACAATGTCAC  
CCTGAATGTTTGCCCCAGGCTATGAATATAACCTGCACAGGCCGCGGGCCTGATAACTGC

ATCCAGTGTGCTCATTACATAGATGGACCTCACTGTGTGAAAACCTGCCCGGCCGGAGTT  
ATGGGAGAAAAACAACACTCTGGTGTGGAAATACGCTGATGCAGGCCACGTGTGCCACCTT  
TGTCACCCGAATTGTACATATGGGTGTACCGTCTGGACTTGAAGGTTGCCCTACCAAT  
GGCCCTAAATACCCAGTATCGCAACTGGCATGGTAGGCGCTCTTCTCTTGCTCTTGTA  
GTTGCTCTCGGCATAGGTCTTTTATG

[0537] SEQ ID NO:76 LTG\_D0015 (Ef1a\_CD33\_4 VH CD8 BBz T2A tEGFR) 的氨基酸序列  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVR  
QAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAK  
ENVDWGQGT LTVSSAAATTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP  
EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR  
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP  
[0538] RSRKRSGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPRAKRM LLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNG  
IGIGEFKDSL SINATNIKHFNCTSGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVK  
EITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGR TKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDG  
DVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPE  
PRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC  
IQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGPGLEGCPN  
GPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

[0539] SEQ ID NO:77 LTG\_D0016 (Ef1a\_CD33\_4 VH CD8 28z T2A tEGFR) 的核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGC  
CAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA  
TACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAA  
GAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACGCTCTCCTCAGCGGCCGCGACTACC  
ACTCCTGCACCACGGCCACCTACCCCAGCCCCACCATTGCAAGCCAGCCACTTTCCTG  
CGCCCCGAAGCGTGTAGACCAGCTGCTGGAGGAGCCGTGCATACCCGAGGGCTGGACTTC  
GCCTGTGACATCTACATCTGGGCCCCATTGGCTGGAACCTTGCGGCGTGCTGCTCTTGTCT  
CTGGTCATTACCCTGTACTGCCGGTCAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCGACTACATG  
AACATGACTCCTAGAAGGCCCGGACCCACTAGAAAGCACTACCAGCCGTACGCCCTCCT  
CGGGATTTGCGCGCATACCGGTCCAGAGTTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGC  
TACCAGCAGGGACAGAACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCCGGCGGGAAGAATAT  
GACGTGCTGGACAAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAGCCGAGGAGGAAG  
AACCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCC  
GAGATCGGCATGAAGGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCATGACGGACTGTACCAGGGC  
CTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGG  
AGAGCTAAACGCTCTGGGTCTGGTGAAGGACGAGGTAGCCTTCTTACGTGCGGAGACGTG  
GAGGAAAACCCAGGACCCCGAGCCAAACGAATGCTGCTGCTTGTACAAGCCTTTTGCTC  
TGCGAACTCCCCCATCCAGCTTTTCTCCTGATTCCAAGGAAGGTTTGCAATGGAATCGGT  
ATAGGGGAGTTTAAGGATTCACTTAGCATAAACGCTACTAATATTAACACTTCAAAAAC  
TGTACGAGTATAAGTGGAGATCTTCACATTTTGCCGGTTGCATTCCGAGGCGATTTCATTC  
ACCCACACGCCACCGCTTGACCCACAAGAATTGGATATTCTTAAACCGTTAAAGAAATA  
ACGGGGTTTTTGTCTATTCAAGCGTGGCCAGAAAATCGCACTGACCTCCATGCTTTCGAG  
AACCTGGAGATTATAAGAGGACGAACCTAAGCAGCATGGTCAATTCTCCCTTGCTGTGGTC  
AGCCTGAACATCACCAGTCTTGGTTTGCGGTCCCTCAAGGAAATTCAGATGGAGATGTC  
ATCATAAGCGGCAACAAGAATTTGTGCTATGCAAAATACCATAAACTGGAAAAAACTGTTT  
GGCACTTCCGGCCAGAAAACCAAGATTATTTCAAATCGGGGTGAGAACAGCTGCAAAGCC  
ACCGGCCAGTTTGTGTCATGCCTTGTGCTCTCCGGAAGGCTGTTGGGGGCCAGAACCCAGC  
GACTCGCTGATTGCAGAAACGTCTCAAGAGCGCGCAATGCGTTGACAAGTTAACCTC  
CTTGAGGGTGAGCCACGAGAGTTTGTGTGAGAACAGCGAGTGTATACAATGTCACCTGAA  
TGTTTGCCCCAGGCTATGAATATAACCTGCACAGGCCGCGGGCCTGATAACTGCATCCAG  
TGTGCTCATTACATAGATGGACCTCACTGTGTGAAAACCTGCCCCGCCGGAGTTATGGGA  
GAAAACAACACTCTGGTGTGGAATAACGCTGATGCAGGCCACGTGTGCCACCTTTGTCAC  
CCGAATTGTACATATGGGTGTACCGGTCCTGGACTTGAAGGTTGCCCTACCAATGGCCCT  
AAAATACCCAGTATCGCAACTGGCATGGTAGGCGCTCTTCTTGTCTTGGTAGTTGCT  
CTCGGCATAGGTCTTTTTATG

[0541] SEQ ID NO:78 LTG\_D0016 (Ef1a CD33\_4 VH CD8 28z T2A tEGFR) 的氨基酸序列  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVR  
QAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAK  
ENVDWGQGTLVTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
ACDIYTWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP  
RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPENMGKPRRK  
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  
[0542] RAKRSGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPRAKRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLI PRKVCNGIG  
IGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEI  
TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV  
IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPR  
DCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQ  
CAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGP  
KIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM

[0543] SEQ ID NO:79 人 IgG4 铰链的核苷酸序列

[0544] **GAGAGCAAATACGGGCGCCATGTCCCCCGTGTCCG**

[0545] SEQ ID NO:80 人 IgG4 铰链的氨基酸序列

[0546] **ESKYGPPCPPCP**

[0547] SEQ ID NO:81 人 IgG4 CH2 结构域的核苷酸序列

- [0548] GCA<sup>-</sup>CCACCAGTTGCTGGCCCTA<sup>+</sup>GTGTCTTCTTGTTC<sup>-</sup>CTCCCAAGCCCAAAGACACCTTG  
ATGATTTCCAGAACTCCTGAGGTTACCTGCGTTGTCGTAGATGTTTCTCAGGAGGACCCA  
GAGGTCCAATTTAACTGGTACGTTGATGGGGTGGAAAGTTCACAATGCGAAGACAAAGCCG  
CGGAAGAACAATTTACGTCCACTTACCGGGTTGTCAGCGTTCTGACGGTATTGCATCAA  
GACTGGCTTAATGGAAAGGAATATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAAGGTTTGCCGAGCAGT  
ATTGAGAAGACCATATCAAAGGCGAAG
- [0549] SEQ ID NO:82人IgG4 CH2结构域的氨基酸序列
- APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
- [0550] DGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS  
SIEKTISKA K
- [0551] SEQ ID NO:83人IgG4 CH3结构域的核苷酸序列
- GGG<sup>-</sup>CAGCCGCGGAGCCACAAG<sup>+</sup>TTTACACTTTGCC<sup>-</sup>GCCATCTCAAGAGGAAATGACTAAA  
AACCAGGTATCCTTGACATGCCTCGTAAAAGGATTTTATCCATCTGATATTGCTGTGGAA  
TGGGAGTCTAACGGGCAGCCGGAATAATTACAAAACCTACACCACCTGTGCTCGATTCA  
GATGGAAGTTTCTTCTTTACAGTAGACTTACGGTGGACAAATCTAGGTGGCAGGAAGGG  
AATGTGTTTAGTTGTAGTGTAAATGCACGAGGCACTTCATAACCACTATACACAGAAGTCA  
CTGAGTTTGAGTCTTGGCAAA
- [0552] TGGGAGTCTAACGGGCAGCCGGAATAATTACAAAACCTACACCACCTGTGCTCGATTCA  
GATGGAAGTTTCTTCTTTACAGTAGACTTACGGTGGACAAATCTAGGTGGCAGGAAGGG  
AATGTGTTTAGTTGTAGTGTAAATGCACGAGGCACTTCATAACCACTATACACAGAAGTCA  
CTGAGTTTGAGTCTTGGCAAA
- [0553] SEQ ID NO:84人IgG4 CH3结构域的氨基酸序列
- GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
- [0554] SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
- [0555] SEQ ID NO:85人IgG4铰链CH2 CH3结构域的核苷酸序列
- GAGAGCAAATACGGGCGCCATGTCCCCCGTGTCCGGCACCACCAGTTGCTGGCCCTAGT  
GTCTTCTTGTTCCTCCCAAGCCCAAAGACACCTTGATGATTTCCAGAACTCCTGAGGTT  
ACCTGCGTTGTCGTAGATGTTTCTCAGGAGGACCCAGAGGTCCAATTTAACTGGTACGTT
- GATGGGGTGGAAAGTTCACAATGCGAAGACAAAGCCGCGGAAGAACAATTTACGTCCACT  
TACCGGGTTGTCAGCGTTCTGACGGTATTGCATCAAGACTGGCTTAATGGAAAGGAATAT  
AAGTGTAAGGTGTCCAACAAAGGTTTGCCGAGCAGTATTGAGAAGACCATATCAAAGGCG  
AAGGGGCAGCCGCGGAGCCACAAGTTTACACTTTGCCGCCATCTCAAGAGGAAATGACT  
AAAAACCAGGTATCCTTGACATGCCTCGTAAAAGGATTTTATCCATCTGATATTGCTGTG  
GAATGGGAGTCTAACGGGCAGCCGGAATAATTACAAAACCTACACCACCTGTGCTCGAT  
TCAGATGGAAGTTTCTTCTTTACAGTAGACTTACGGTGGACAAATCTAGGTGGCAGGAA  
GGGAATGTGTTTAGTTGTAGTGTAAATGCACGAGGCACTTCATAACCACTATACACAGAAG  
TCACTGAGTTTGAGTCTTGGCAAA
- [0556] TCACTGAGTTTGAGTCTTGGCAAA
- [0557] SEQ ID NO:86人IgG4铰链CH2 CH3结构域的氨基酸序列
- ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
- DGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
- [0558] KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
- [0559] SEQ ID NO:87 LTG\_D0035 (Ef1a\_CD33\_4 VH H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28z) 的核  
苷酸序列

[0560]

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGC  
CAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA  
TACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAA  
GAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAGAGC  
AAATACGGGCCGCCATGTCCCCCGTGTCCGGCACCAACAGTTGCTGGCCCTAGTGTCTTC  
TTGTTCCCTCCCAAGCCCAAAGACACCTTGATGATTTCCAGAACTCCTGAGGTTACCTGC  
GTTGTCGTAGATGTTTCTCAGGAGGACCCAGAGGTCCAATTTAACTGGTACGTTGATGGG  
GTGGAAGTTCACAATGCGAAGACAAAGCCGCGGGAAGAACAATTTTCAGTCCACTTACCGG  
GTTGTCAGCGTTCTGACGGTATTGCATCAAGACTGGCTTAATGGAAAGGAATATAAGTGT  
AAGGTGTCCAACAAAGGTTTGCCGAGCAGTATTGAGAAGACCATATCAAAGGCGAAGGGG  
CAGCCGCGCGAGCCACAAGTTTACACTTTGCCGCCATCTCAAGAGGAAATGACTAAAAAC  
CAGGTATCCTTGACATGCCTCGTAAAAGGATTTTATCCATCTGATATTGCTGTGGAATGG  
GAGTCTAACGGGCAGCCGAAAATAATTACAAAACCTACACCACCTGTGCTCGATTGAGAT  
GGAAGTTTCTTCTTTACAGTAGACTTACGGTGGACAAATCTAGGTGGCAGGAAGGGAAT  
GTGTTTAGTTGTAGTGTAAATGCACGAGGCACTTCATAACCACTATACACAGAAGTCACTG  
AGTTTGAGTCTTGCGAAAATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTT  
CTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCCGGTGAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCC

GACTACATGAACATGACTCCTAGAAAGGCCCGGACCCACTAGAAAGCACTACCAGCCGTAC  
GCCCCCTCCTCGGGATTTGCGCCGATACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGAT  
GCACCGGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCCGGCGG  
GAAGAATATGACGTGCTGGACAAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCG  
AGGAGGAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAA  
GCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGAGAGGGAAGGGTCATGACGGACTG  
TACCAGGGCCTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTG  
CCCCCGCGG

[0561] SEQ ID NO:88 LTG\_D0035 (Ef1a\_CD33\_4 VH H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28z) 的氨基酸序列

[0562]

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVR  
QAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAK  
ENVDWGQGTLVTVSSAAESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSL  
SLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY  
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP  
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL  
PPR

## 序列表

<110> LENTIGEN TECHNOLOGY, INC.  
THE U. S. A., AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

<120> 用于用抗CD33免疫疗法治疗癌症的组合物和方法

<130> 42449-0013W01

<150> 62/476,438

<151> 2017-03-24

<150> 62/620,139

<151> 2018-01-22

<160> 88

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc      60
tctgtgcag cctctggatt caccctcagt agctatggca tgagctgggt ccgccagget      120
ccaaggaagg gctctggagt gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac      180
ccgtccctca agagtcgagt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg      240
caaatgaaca gcttgagagc cgaggacaca gccacgtatt actgtgcgag acccctcaac      300
tactactact actacatgga cgtctggggc aaagggacca cggtcaccgt ctccctca      357
```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
```

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

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

```
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50           55           60
```

```
Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65           70           75           80
```

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

```
Arg Pro Leu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly
100          105          110
```

```
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115
```

<210> 3

<211> 339

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

```
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc      60
```

[0001]

```

tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgagctgggt cgcagggt 120
ccaagacaag ggtttgagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180
gcggactcag tgaagggccg attcaccatc tcagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acagccacgt attactgtgc gaaagaaaat 300
gtggactggg gccaggcac cctggtcacc gtctctca 339

```

<210> 4  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 4

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

[0002]

```

Ala Lys Glu Asn Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100          105          110

```

Ser

<210> 5  
 <211> 747  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 5

```

caggtgcagc tgggtcaatc tggggcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaggatc 60
tcctgtaagg gttctggatt cagttttccc acctactgga tcggtgggtg gccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagactagtt 300
ggagatggct acaatacggg ggcitttgat atctggggcc aagggacaaat ggtcaccgtc 360
tcttcaggag gtggcgggtc tgggtgtggc ggtagcggtg gtggcggatc cgatattgtg 420
atgaccacaa ctccactctc tctgtccgtc accctggac agccggcctc catctctgce 480
aagtctagtc agagcctcct gcatagtaat ggaaagacct attgtattg gtacctgcag 540
aagccaggcc agcctccaca gctcctgate tatggagctt ccaaccggtt ctctggagtg 600
ccagacaggt tcagtggcag cgggtcaggg acagatttca cactgaaaat cagccgggtg 660
gaggtcaggg atgttgggtt ttattactgc atgcaaagta tacagcttcc tateacette 720
ggccaaggga cacgactgga gattaaa 747

```

<210> 6  
 <211> 249



	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 6	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu	
	1 5 10 15	
	Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Ser Phe Pro Thr Tyr	
	20 25 30	
	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met	
	35 40 45	
	Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe	
	50 55 60	
	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Ala Arg Leu Val Gly Asp Gly Tyr Asn Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp	
	100 105 110	
	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
	115 120 125	
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr His Thr	
	130 135 140	
[0003]	Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys	
	145 150 155 160	
	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr	
	165 170 175	
	Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly	
	180 185 190	
	Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly	
	195 200 205	
	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp	
	210 215 220	
	Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Ile Thr Phe	
	225 230 235 240	
	Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
	245	
	<210> 7	
	<211> 759	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 7	
	caggtaacgc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctgcagac cctctcactc	60
	acctgtgcc a tctccgggga cagtgtctct agcaacactg ctgcttgga c ttgatcagg	120
	cagtccecat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat	180
	aatgattatg cagtcctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac	240
	cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggtgtgta ttactgtgca	300

```

agagaaacgt attactatgg ttcggggagt tattgggatg cttttgatat ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ctcaggaggt ggcgggtctg gtagtggcgg tagcgggtgt 420
ggcgatccc agtcgtctgt gacgcagccg ccttcagtgt ctgcggcccc aggacagaag 480
gtccacatct cctgctctgg aagcagctcc aacattggga ataattatgt atcctggtac 540
cagcagctcc caggcacggc ccccaaactc ttcattata aaaataatca gcggccctca 600
gaggtccctg accgattctc ttgctccaag tcggcacct cagctccct ggccatcagt 660
gggtccagt ctgacgatga ggctgactac tactgtgcag catgggatga caggctgaat 720
ggatatgtct tcggaactgg gaccaaggtc accgtccta 759

```

<210> 8  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30

Thr Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
 50 55 60

Val Pro Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
 65 70 75 80

[0004]

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Trp  
 100 105 110

Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln  
 130 135 140

Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys  
 145 150 155 160

Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr  
 165 170 175

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Phe Ile  
 180 185 190

Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Glu Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 195 200 205

Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser  
 210 215 220

Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn  
 225 230 235 240

Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

245

250

<210> 9  
 <211> 741  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 9  
 caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60  
 acctgtgcc a tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttggaa ctggatcagg 120  
 cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaggagcat actacaggtc caagtggat 180  
 aatgattatg cagtatctgt gaaaagtga ataattatca acgcagacac atcgaagaac 240  
 cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgcg 300  
 aggggatatt actatgatag taccgactgg ttcgacctt ggggccaggg aaccctggtc 360  
 accgtctcct caggagggtg cgggtctggt ggtggcggta gcggtggtg cggatcctct 420  
 tctgagctga ctcaggacct aactgtgtct gtggccttgg gacagacagt caggatcaca 480  
 tgccaaggag acagcctcag aagctattat gcaagctggt accagcagaa gccaggacag 540  
 gccctgtac ttgtcatcta tggtaaaac aaccggcct caggatccc agaccgatc 600  
 tctggtcca gtcaggaaa cacagcttcc ttgaccatca ctggggctca ggcggaagat 660  
 gaggtgact attactgttc ctcccgggac ggcagtggtc atccatatct ctccggacct 720  
 gggaccaagg tcaccgttct t 741

<210> 10  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 10

[0005]

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Gly Gly Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
 50 55 60  
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Ile Ile Asn Ala Asp Thr Ser Lys Asn  
 65 70 75 80  
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Asp Ser Thr Asp Trp Phe Asp  
 100 105 110  
 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Glu Leu Thr  
 130 135 140  
 Gln Asp Pro Thr Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg  
180 185 190

Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr  
195 200 205

Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
210 215 220

Tyr Cys Ser Ser Arg Asp Gly Ser Gly His Pro Tyr Leu Phe Gly Pro  
225 230 235 240

Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
245

<210> 11  
<211> 735  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 11  
gaggtccagc tgggtcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60  
tctgttaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120  
cccggaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180  
agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240  
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactgact 300  
acggctgggg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcaggaggt 360  
ggcgggtctg gtggtggcgg tagcgggtgt ggcggatccg aaattgtgct gactcagtct 420  
ccactctccc tgcctgcac ccttggacag ccggcctcca tctcctgcag gtctagtcaa 480  
agcctcgtac acagtgatgg aaacacctac ttgagttggc ttcaccagag gccaggccag 540  
cctccaagac tctaatgta taagatttct aaccggttct ctggggtcac agacagattc 600  
agtggcagcg ggtcagggac agatttcaca ctgaaaatca gccgggtgga ggctgaggat 660  
gttgggggtt attactgcat gcaaggtata cacctaccgc tcactttcgg cggaggggacc 720  
aagctggaga tcaaa 735

[0006]

<210> 12  
<211> 245  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 12  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Thr Thr Ala Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu  
130 135 140

Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln  
145 150 155 160

Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu His Gln  
165 170 175

Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Met Tyr Lys Ile Ser Asn Arg  
180 185 190

Phe Ser Gly Val Thr Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
195 200 205

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr  
210 215 220

Tyr Cys Met Gln Gly Ile His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys  
245

[0007]

<210> 13  
<211> 66  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 前导/信号肽序列

<400> 13  
atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcattccggc gtttctgctg 60  
attccg 66

<210> 14  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 前导/信号肽序列

<400> 14

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> 15  
<211> 1101  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LTG 1905\_(EF1a- VH-2 CD33-CD8 TM-41BB-CD3 ζ)

<400> 15  
atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcattccggc gtttctgctg 60  
attccggagg tgcagctggt ggagctcggg ggaggcttgg tacagcctgg agggtcctg 120

```

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgag ctgggtccgc      180
caggctccaa ggaaggcctt ggagtggatt ggggaaatca atcatagtgg aagcaccaac      240
tacaaccctt cctcaagag tcgagtcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg      300
tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacagcca cgtattactg tgcgagaccc      360
ctcaactact actactacta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt caccgtctcc      420
tcagcggcgg caactaccac cctgccccct cggccgccga ctccggcccc aaccatcgca      480
agccaacccc tctccttgcg ccccgaaagt tgcggcccg cgcgggtgg agccgtgcat      540
acccgggggc tggactttgc ctgcgataac tacatttggg ccccgctggc cggcacttgc      600
ggcgtgtccc tgcgtgctgt ggtcatcacc ctttactgca agaggggccc gaagaagctg      660
ctttacatct tcaagcagcc gttcatcgcc cccgtgcaga cgactcagga agaggacgga      720
tgctcgtgca gattccctga ggaggaagag gggggatgcg aactgcgcgt caagttctca      780
cggtcggccg acgccccgcg atatcaacag ggccagaatc agctctacaa cgagctgaac      840
ctgggaagga gagaggagta cgacgtgtgt gacaagcgac gcggacgcca cccggagatg      900
ggggggaaac cacggcggaa aaacctcag gaaggactgt acaacgaact ccagaaagac      960
aagatggcgg aagcctactc agaaatcgcc atgaaggagg agcggaggag gggaaagggt     1020
cacgacgggc tgtaccaggg actgagcacc gccactaagg atacctacga tgccttgcac     1080
atgcaagcac tcccaccccg g                                     1101

```

<210> 16  
 <211> 367  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0008]

<220>  
 <223> LTG 1905\_(EF1a- VH-2 CD33 -CD8 TM-41BB-CD3 ζ)

<400> 16

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
 20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 35 40 45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn  
 65 70 75 80

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
 100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Leu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met  
 115 120 125

Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala  
 130 135 140

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
 145 150 155 160

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
165 170 175

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile  
180 185 190

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val  
195 200 205

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg  
245 250 255

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
260 265 270

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp  
275 280 285

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro  
290 295 300

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp  
305 310 315 320

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
325 330 335

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
340 345 350

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
355 360 365

<210> 17  
<211> 1083  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LTG 1906 (EF1a- VH-4 CD33 -CD8 TM-41BB-CD3 ζ) 核酸序列

<400> 17  
atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcattccggc gttttctgctg 60  
attccggagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg agggtcctcg 120  
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgag ctgggtccgc 180  
caggctccaa gacaagggtc tgagtgggtg gccaacataa agcaagatgg aagtgagaaa 240  
tactatgcgg actcagtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300  
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacag ccacgtatta ctgtgcgaaa 360  
gaaaatgtgg actggggcca gggcacctg gtcaccgtct cctcagcggc cgcaactacc 420  
acccctgccc ctggccggcc gactccggcc ccaaccatcg caagccaacc cctctccttg 480  
cgccccgaag cttgccgcc ggcccggggt ggagccgtgc ataccgggg gctggacttt 540  
gcctgcgata tctacatttg gccccgctg gccggcactt gcggcgtgt cctgctgtcg 600  
ctggtcatca ccttttactg caagaggggc cggaagaagc tgcctttacat cttaagcag 660  
ccgttcacgc ggccccgtga gacgactcag gaagaggacg gatgctcgtg cagattccct 720

```

gaggaggaag aggggggatg cgaactgcgc gtcaagttct cacggtcgc cgacgcccc 780
gcataatcaac agggccagaa tcagctctac aacgagctga acctgggaag gagagaggag 840
tacgagctgc tggacaagcg acgcgacgc gacccggaga tgggggggaa accacggcgg 900
aaaaaccctc aggaaggact gtacaacgaa ctccagaaag acaagatggc ggaagcctac 960
tcagaaatcg ggatgaagg agagcggagg aggggaaagg gtcacgacgg gctgtaccag 1020
ggactgagca ccgccactaa ggatacctac gatgccttgc atatgcaagc actcccaccc 1080
cgg 1083

```

<210> 18  
 <211> 361  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LTG 1906 (EF1a- VH-4 CD33 -CD8 TM-41BB-CD3ζ) 核酸序列

<400> 18

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
35 40 45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg  
50 55 60

[0010]

Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys  
65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
100 105 110

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asn Val Asp Trp Gly Gln Gly  
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro  
130 135 140

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu  
145 150 155 160

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg  
165 170 175

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly  
180 185 190

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys  
195 200 205

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg  
210 215 220

Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro  
225 230 235 240



Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser  
 245 250 255  
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu  
 260 265 270  
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg  
 275 280 285  
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln  
 290 295 300  
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr  
 305 310 315 320  
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp  
 325 330 335  
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala  
 340 345 350  
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 355 360

<210> 19  
 <211> 1491  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LTG1936\_(EF1a\_ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3ζ CAR)

[0011]

<400> 19  
 atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcattccggc gtttctgctg 60  
 attccgcagg tgcagctggt gcaatctggg gcagagggtga aaaagcccg ggagtctctg 120  
 aggatctcct gtaaggggtc tggattcagt tttccacct actggatcgg ctgggtgcgc 180  
 cagatgcccg ggaagggcct ggagtggatg gggaicattc aicctgggtga ctctgatacc 240  
 agatacagcc cgtccctcca aggccaggtc accatctcag ccgacaagtc catcagcacc 300  
 gcctacctgc agtggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgaga 360  
 ctagtgggag atggtacaa tacgggggct tttgatattt ggggccaagg gacaatggtc 420  
 accgtctctt caggagggtg cgggtctggt ggtggcggta gcggtggtg cggtaccgat 480  
 attgtgatga cccacactcc actctctctg tccgtacccc ctggacagcc ggcctccatc 540  
 tcctgcaagt ctatgcagag cctcctgcat agtaattgaa agacctatct gtattgggtac 600  
 ctgcagaagc caggccagcc tccacagctc ctgatctatg gagcttccaa ccggttctct 660  
 ggagtgccag acagggtcag tggcagcggg tcagggacag atttcacact gaaaatcagc 720  
 cgggtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgcatgc aaagtataca gcttccatc 780  
 accttcggcc aaggacacg actggagatt aaagcggcgc caactaccac cctgcccct 840  
 cggccgccga ctccggcccc aaccatcgca agccaacccc tctccttgcg ccccgaaagt 900  
 tgcgcgccgg ccgcggtgg agccgtgcat acccggggga tggactttgc ctgcgatac 960  
 tacatttggg ccccgctggc cggcacttgc ggcgtgctcc tgetgtcget ggtcaccac 1020  
 ctttactgca agagggggcg gaagaagctg ctttacctct tcaagcagcc gticattgcgg 1080  
 cccgtgcaga cgactcagga agaggacgga tgctcgtgca gattccctga ggaggaaagag 1140  
 gggggatgcg aactgcgcgt caagttctca cggtcgcgc acgccccgc atatcaacag 1200  
 ggccagaate agctctacaa cgagctgaac ctgggaagga gagaggagta cgacgtgctg 1260  
 gacaagcgac gcggacgca cccggagatg ggggggaaac cagggcgga aaacctcag 1320

gaaggactgt acaacgaact ccagaaagac aagatggcgg aagcctactc agaaatcggg 1380  
 atgaaggagg agcggaggag gggaaagggt cagcagggc tgtaccaggg actgagcacc 1440  
 gccactaagg atacctacga tgccttgcac atgcaagcac tcccaccccg g 1491

<210> 20  
 <211> 497  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LTG1936\_(EF1a\_ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ CAR)

<400> 20

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 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu  
 20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly  
 35 40 45

Phe Ser Phe Pro Thr Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly  
 50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
 65 70 75 80

Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys  
 85 90 95

[0012] Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp  
 100 105 110

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Val Gly Asp Gly Tyr Asn Thr  
 115 120 125

Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp  
 145 150 155 160

Ile Val Met Thr His Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln  
 165 170 175

Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn  
 180 185 190

Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 195 200 205

Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
 210 215 220

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
 225 230 235 240

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Ile  
 245 250 255

Gln Leu Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Ala  
 260 265 270

Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr  
275 280 285

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala  
290 295 300

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile  
305 310 315 320

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser  
325 330 335

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr  
340 345 350

Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu  
355 360 365

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu  
370 375 380

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln  
385 390 395 400

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu  
405 410 415

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly  
420 425 430

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln  
435 440 445

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu  
450 455 460

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr  
465 470 475 480

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro  
485 490 495

Arg

<210> 21  
<211> 1503  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LTG1937\_(EF1a\_ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ CAR)

<400> 21  
atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcacccggc gttttctgctg 60  
attccgcagg tacagctgca gcagtcaggc ccaggactgg tgaagccctc gcagaccctc 120  
tcactcacct gtgccatctc cggggacagt gtctctagca acactgctgc ttggaactgg 180  
atcaggcagt ccccatcgag aggccttgag tggctgggaa ggacatacta caggtccaag 240  
tggtataatg attatgcagt cctgtgaaa agtcgaataa ccatcaaccc agacacatcc 300  
aagaaccagt tctccctgca gctgaactct gtgactcccg aggacacggc tgtgtattac 360  
tgtgcaagag aaacgtatta ctatggttcg gggagttatt gggatgcttt tgatactgg 420  
ggccaaggga ccacgggtcac cgtctcctca ggaggtggcg ggtctggtag tggcggtagc 480

```

ggtagtgacg gatccagtc tgctgtgacg cagccgccct cagtgtctgc ggccccagga      540
cagaaggta ccatctctg ctctggaagc agctccaaca ttgggaataa ttatgtatcc      600
tggtaccagc agctccagg caggccccc aaactcttca tctataaaaa taatcagcgg      660
ccctcagagg tccctgaccg attctctggc tccaagtctg gcacctcagc ctccctggcc      720
atcagtgggc tccagtctga cgatgaggct gactactact gtgcagcatg ggatgacagg      780
ctgaatggat atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctagcggc cgcaactacc      840
acccctgccc ctggccgcc gactccggcc ccaaccatcg caagccaacc cctctccttg      900
cgccccgaag ctgcccgcc ggcccggggt ggagccgtgc ataccggggg gctggacttt      960
gcctgcgata tctacatttg ggccccgtg gccggcactt gggcggtgct cctgctgtcg     1020
ctggtcacga ccttttactg caagaggggc cggaagaagc tgettacat ctccaagcag     1080
ccgttcacgc ggcccgtagc gacgactcag gaagaggacg gatgctcgtg cagattccct     1140
gaggaggaag aggggggatg cgaactgcgc gtcaagttct cagggtccgc cgacgcccc     1200
gcataatcac agggccagaa tcagctctac aacgagctga acctgggaag gagagaggag     1260
tacgacgtgc tggacaagcg acgcggacgc gacccggaga tgggggggaa accacggcgg     1320
aaaaaccctc aggaaggact gtacaacgaa ctccagaaag acaagatggc ggaagcctac     1380
tcagaaatcg ggaatgaagg agagcggagg aggggaaagg gtcacgacgg gctgtaccag     1440
ggactgagca ccgccactaa ggatacctac gatgccttgc atatgcaagc actcccaccc     1500
cgg                                     1503

```

<210> 22  
 <211> 501  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0014]

<220>  
 <223> LTG1937\_(EF1a\_ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ CAR)

<400> 22

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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly  
 20 25 30

Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly  
 35 40 45

Asp Ser Val Ser Ser Asn Thr Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser  
 50 55 60

Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys  
 65 70 75 80

Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Pro Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn  
 85 90 95

Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr  
 100 105 110

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Tyr Tyr Tyr  
 115 120 125

Gly Ser Gly Ser Tyr Trp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
 130 135 140

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser

[0015]

145	150	155	160
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser	165	170	175
Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser	180	185	190
Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr	195	200	205
Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Glu Val	210	215	220
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala	225	230	235
Ile Ser Gly Leu Gln Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala	245	250	255
Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val	260	265	270
Thr Val Leu Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr	275	280	285
Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala	290	295	300
Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe	305	310	315
Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val	325	330	335
Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys	340	345	350
Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr	355	360	365
Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu	370	375	380
Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro	385	390	395
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly	405	410	415
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro	420	425	430
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr	435	440	445
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly	450	455	460
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln	465	470	475
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln	485	490	495

Ala Leu Pro Pro Arg  
500

<210> 23  
<211> 1485  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LTG1938\_(EF1a\_ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ)

<400> 23  
atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcattccggc gtttctgctg 60  
attccgcagg tacagctgca gcagtcaggt ccaggactgg tgaagccctc gcagaccctc 120  
tcactcactc gtgccatctc cggggacagt gtctctagca acagtgtctg ttggaactgg 180  
atcaggcagt ccccatcgag aggccttgag tggctgggag ggacatacta caggtccaag 240  
tggatataatg attatgcagt atctgtgaaa agtcgaataa ttatcaacgc agacacatcg 300  
aagaaccagt tctccctgca gctgaactct gtgactcccg aggacacggc tgtgtattac 360  
tgtgcgaggg gatattacta tgaatgtacc gactgggtcg acccctgggg ccagggaacc 420  
ctggtcaccg tctcctcagg aggtggcggg tctgggtgtg gcggtagcgg tgggtggcga 480  
tctcttctg agctgactca ggaccaact gtgtctgtgg ccttgggaca gacagtcagg 540  
atcacatgcc aaggagacag cctcagaagc tattatgcaa gctggtacca gcagaagcca 600  
ggacaggccc ctgtacttgt catctatggt aaaaacaacc ggccctcagg gatccagac 660  
cgattctctg gctccagctc aggaaacaca gcttcttga ccatcactgg ggctcaggcg 720  
gaagatgagg ctgactatta ctgttctcc cgggacggca gttgtcatcc atatctcttc 780  
ggacctggga ccaaggtcac cgttcttgcg gccgcaacta ccaccctgc cctcgggccg 840  
[0016] ccgactccgg ccccaacct cgaagccaa cccctctct tgcgccccga agcttgccgc 900  
ccggccgcgg gtggagccgt gcataccgg gggtggact ttgctgcga tatctacatt 960  
tgggccccgc tggccggcac ttggggctg ctctgtgtg cgctggteat caccctttac 1020  
tgcgaagggg gccggaagaa gctgctttac atcttcaagc agccgttcat gcggcccggtg 1080  
cagacgactc aggaagagga cggatgctg tgcagattcc ctgaggagga agagggggga 1140  
tgcgaactgc gcgtcaagtt ctcacggtec gccgacgcc ccgcataatc acagggccag 1200  
aatcagctct acaacgagct gaacctggga aggagagagg agtacgacgt gctggacaag 1260  
cgacgcggac gcgaccggga gatggggggg aaaccacggc ggaaaaaccc tcaggaagga 1320  
ctgtacaacg aactccagaa agacaagatg gcggaagcct actcagaaat cgggatgaag 1380  
ggagagcgga ggaggggaaa gggtcacgac gggtgtacc agggactgag caccgccact 1440  
aaggatacct acgatgcctt gcataatgaa gcactccac ccg 1485

<210> 24  
<211> 495  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LTG1938\_(EF1a\_ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ)

<400> 24

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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly  
20 25 30

Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly

	35	40	45
	Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser 50 55 60		
	Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Gly Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys 65 70 75 80		
	Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Ile Ile Asn 85 90 95		
	Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr 100 105 110		
	Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Asp 115 120 125		
	Ser Thr Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val 130 135 140		
	Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 145 150 155 160		
	Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Thr Val Ser Val Ala Leu Gly 165 170 175		
	Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr 180 185 190		
	Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile 195 200 205		
[0017]	Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly 210 215 220		
	Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala 225 230 235 240		
	Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Arg Asp Gly Ser Gly His 245 250 255		
	Pro Tyr Leu Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ala Ala Ala 260 265 270		
	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala 275 280 285		
	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly 290 295 300		
	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile 305 310 315 320		
	Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val 325 330 335		
	Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe 340 345 350		
	Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly 355 360 365		
	Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg 370 375 380		

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
385 390 395 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp  
405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro  
420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp  
435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
450 455 460

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
465 470 475 480

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485 490 495

<210> 25  
<211> 1479  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LTG1939\_(EF1a\_ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ)

<400> 25  
atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcacccggc gtttctgctg 60  
attccggagg tccagctggt gcagctctga gcagagggtg aaaagcccgg ggagctctctg 120  
[0018] aagatctcct gtaagggttc tggatacagc ttaccagct actggatcgg ctgggtgcgc 180  
cagatgcccg ggaaaggcct ggagtggtat gggatcatct atcctgggtg ctctgatacc 240  
agatacagcc cgtccttcca aggccaggtc accatctcag ccgacaagtc catcagcacc 300  
gcctacctgc agtggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgaga 360  
ctgactacgg ctgggggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctca 420  
ggagggtggc ggtctgttgg tggcggtagc ggtgggtggc gatccgaaat tgtctgact 480  
cagtctccac tctccctgcc cgtcaccctt ggacagccgg cctccatctc ctgcaggctt 540  
agtcaagacc tcgtacacag tgatggaaac acctacttga gtggcttca ccagaggcca 600  
ggccagcctc caagactcct aatgtataag atttctaacc ggttctctgg ggtcagac 660  
agattcagtg gcagcgggtc agggacagat ttacactga aaatcagccg ggtggaggct 720  
gaggatgttg gggtttatta ctgcatgcaa ggtatacacc taccgctcac ttccggcgga 780  
gggaccaagc tggagatcaa agcggccgca actaccacc ctcgccctcg gccgccgact 840  
ccggcccca ccatcgcaag ccaacccctc tcttgcgcc ccgaagcttg ccgccggcc 900  
gcgggtggag ccgtgcatac ccgggggtg gactttgcct gcgatatcta catttgggcc 960  
ccgtggccg gcacttgcgg cgtgctcctg ctgtcgttgg tcatcaccct ttactgcaag 1020  
aggggccgga agaagctgct ttacatcttc aagcagccgt tcatgcggcc cgtgcagacg 1080  
actcaggaag aggacggatg ctctgtcaga ttccctgagg aggaagaggg gggatgcgaa 1140  
ctgcgcgtca agttctcacg gtccgccgac gccccgcac atcaacaggg ccagaatcag 1200  
ctctacaacg agctgaacct gggaaggaga gaggagtacg acgtgcttga caagcagcgc 1260  
ggacgcgacc cggagatggg gggaagacca cggcgaaaa accctcagga aggactgtac 1320  
aacgaactcc agaagacaa gatggcggaa gcctactcag aaatcgggat gaaggagag 1380



cggaggaggga gaaagggtca cgacgggctg taccagggaac tgagcaccgc cactaaggat 1440  
 acctacgatg ccttgcataat gcaagcactc ccaccccg 1479  
  
 <210> 26  
 <211> 493  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> LTG1939\_(EF1a\_ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ)  
  
 <400> 26  
 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 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu  
 20 25 30  
  
 Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly  
 35 40 45  
  
 Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly  
 50 55 60  
  
 Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
 65 70 75 80  
  
 Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys  
 85 90 95  
  
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp  
 100 105 110  
  
 Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Thr Ala Gly Gly Met Asp  
 115 120 125  
  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr  
 145 150 155 160  
  
 Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile  
 165 170 175  
  
 Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
 180 185 190  
  
 Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Met  
 195 200 205  
  
 Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Thr Asp Arg Phe Ser Gly  
 210 215 220  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
 225 230 235 240  
  
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Ile His Leu Pro Leu  
 245 250 255  
  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala Thr Thr  
 260 265 270  
  
 Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln  
 275 280 285

[0019]

	Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala 290 295 300	
	Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala 305 310 315 320	
	Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr 325 330 335	
	Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln 340 345 350	
	Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser 355 360 365	
	Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys 370 375 380	
	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln 385 390 395 400	
	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu 405 410 415	
	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg 420 425 430	
	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met 435 440 445	
[0020]	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly 450 455 460	
	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp 465 470 475 480	
	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg 485 490	
	<210> 27 <211> 72 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 27 atctacatct gggcgccctt ggccgggaact tgtggggtec ttctctgtc actggttatac accctttact gc	60 72
	<210> 28 <211> 22 <212> PRT <213> 智人	
	<400> 28 Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu 1 5 10 15	
	Val Ile Thr Leu Tyr Cys 20	
	<210> 29 <211> 135 <212> DNA <213> 智人	

<400> 29  
 accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgic gcagccctg 60  
 tcctcgccc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120  
 gacttcgcct gtgat 135

<210> 30  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 30

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

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

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

<210> 31  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 31

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

[0021] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 35 40

<210> 32  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 32

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

<210> 33  
 <211> 126  
 <212> DNA  
 <213> 智人

[0022]	<400> 33	
	aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa	60
	actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt	120
	gaactg	126
	<210> 34	
	<211> 42	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 34	
	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> 35	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域	
	<400> 35	
	agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcaggggcca gaaccagctc	60
	tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc	120
	cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	180
	gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	240
	cggaggggca agggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc	300
	tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc	336
	<210> 36	
	<211> 112	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CD3- $\zeta$ 的信号转导结构域	
	<400> 36	
	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly	
	1 5 10 15	
	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr	
	20 25 30	
	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys	
	35 40 45	
	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys	
	50 55 60	
	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg	
	65 70 75 80	
	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala	
	85 90 95	
	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	

	100	105	110
<210> 37			
<211> 726			
<212> DNA			
<213> 小家鼠 (Mus musculus)			
<400> 37			
gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	60		
atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aaatatattaa attggtatca gcagaaacca	120		
gatggaactg ttaaactcct gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtcccatca	180		
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa	240		
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg	300		
gggaccaagc tggagatcac aggtggcggt ggctcgggcg gtggtgggtc gggcggcggc	360		
ggatctgagg tgaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg	420		
tcctgcacat gcactgtctc aggggtctca ttaccgact atggtgtaag ctggattcgc	480		
cagctccac gaaagggtct ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac	540		
tataattcag ctctcaaac cagactgacc atcatcaagg acaactccaa gagccaagtt	600		
ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca ttactactg tgccaacat	660		
tattactacg gtggtagcta tctatggac tactggggcc aaggaacctc agtcaccgtc	720		
tcctca	726		
<210> 38			
<211> 242			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 38			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
1 5 10 15			
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr			
20 25 30			
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
35 40 45			
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50 55 60			
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln			
65 70 75 80			
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr			
85 90 95			
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser			
100 105 110			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu			
115 120 125			
Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys			
130 135 140			
Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg			
145 150 155 160			
Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser			
165 170 175			

[0023]

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile  
180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln  
195 200 205

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

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

Ser Ser

<210> 39  
<211> 66  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> GMCSF前导肽

<400> 39  
atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcatccggc gttttctgctg 60  
attccg 66

<210> 40  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 人工

[0024]

<220>  
<223> GMCSF前导肽

<400> 40

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> 41  
<211> 85  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> TNFRSF19前导肽

<400> 41  
ggctctgaaa gtgctgttgg aacaagaaaa gaccttcttc accttgctcg tgttgctggg 60  
gtacctgtcc tgcaaagtea cctgt 85

<210> 42  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> TNFRSF19前导肽

<400> 42

Met Ala Leu Lys Val Leu Leu Glu Gln Glu Lys Thr Phe Phe Thr Leu  
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Tyr Leu Ser Cys Lys Val Thr Cys  
20 25

[0025]	<210>	43	
	<211>	63	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	CD8 $\alpha$ 前导肽	
	<400>	43	
		atggcgctgc cggtgaccgc gctgctgctg ccgctggcgc tgctgctgca tgcggcgcgc	60
		ccg	63
	<210>	44	
	<211>	21	
	<212>	PRT	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	CD8 $\alpha$ 前导肽	
	<400>	44	
		Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
		1 5 10 15	
		His Ala Ala Arg Pro	
		20	
	<210>	45	
	<211>	123	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	CD28共刺激结构域	
	<400>	45	
		cggtcgaaga ggtccagact ctgcaactcc gactacatga acatgactcc tagaaggccc	60
		ggaccacta gaaagcacta ccagccgtac gccctctctc gggatttcgc cgcataccgg	120
		tcc	123
	<210>	46	
	<211>	41	
	<212>	PRT	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	CD28共刺激结构域	
	<400>	46	
		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>	47	
	<211>	336	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	CD3 $\zeta$ 活化结构域	
	<400>	47	
		agagtgaagt tcagccgctc agccgatgca ccggcctacc agcagggaca gaaccagctc	60
		tacaacgagc tcaacctggg tcggcgggaa gaatatgacg tgctggacaa acggcgcggc	120
		agagatccgg agatgggggg aaagccgagg aggaagaacc ctcaagaggg cctgtacaac	180

	gaactgcaga aggacaagat ggcggaagcc tactccgaga tcggcatgaa gggagAACgc	240
	cggagaggga agggatcatga cggactgtac caggccctgt caactgccac taaggacact	300
	tacgatgcgc tccatatgca agctttgcc ccgcgg	336
	<210> 48	
	<211> 112	
	<212> PRT	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> CD3 ζ 活化结构域	
	<400> 48	
	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	
[0026]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
	100 105 110	
	<210> 49	
	<211> 201	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> TNFRSF19铰链和跨膜结构域	
	<400> 49	
	ggggccgcgg tcggattcca agacatggaa tgcgtgccct gcggcgaccc gccacctcct	60
	tacgagccgc actgcgcac gaaggtcaac ctctgaaga tcgcgagcac cgcgtctctca	120
	ccccgggata ctgctctggc cgccgtgatt tgttccgct tggccaccgt gcttctggcc	180
	ctgctgatcc tctgtgtgat c	201
	<210> 50	
	<211> 22	
	<212> PRT	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> TNFRSF19铰链和跨膜结构域	
	<400> 50	
	Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu	
	1 5 10 15	
	Leu Ile Leu Cys Val Ile	
	20	
	<210> 51	
	<211> 63	
	<212> DNA	



<213>	人工	
<220>		
<223>	TNFRSF19跨膜结构域	
<400>	51	
	gccgccgtga ttgttccgc cttggccacc gtgcitctgg ccttctgat cctctgtgtg	60
	atc	63
<210>	52	
<211>	21	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	TNFRSF19跨膜结构域	
<400>	52	
	Ala Ala Val Ile Cys Ser Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu	
	1 5 10 15	
	Ile Leu Cys Val Ile	
	20	
<210>	53	
<211>	138	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	TNFRSF19铰链结构域	
<400>	53	
	ggggccgcgg tcggattcca agacatggaa tgcgtgccct gcggcgaccc gccacetcet	60
	tacgagccgc actgcgcctc gaaggccaac ctcgtgaaga tcgcgagcac cgcgtctctca	120
[0027]	ccccgggata ctgctctg	138
<210>	54	
<211>	46	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	TNFRSF19铰链结构域	
<400>	54	
	Ala Ala Ala Val Gly Phe Gln Asp Met Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp	
	1 5 10 15	
	Pro Pro Pro Pro Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val	
	20 25 30	
	Lys Ile Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu	
	35 40 45	
<210>	55	
<211>	80	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	截短的TNFRSF19铰链结构域	
<400>	55	
	tacgagcctc actgcgccag caaagtcaac ttggtgaaga tcgcgagcac tgcctcgtcc	60
	cctcgggaca ctgctctggc	80
<210>	56	
<211>	26	
<212>	PRT	
<213>	人工	

<220>  
 <223> 截短的TNFRSF19铰链结构域  
 <400> 56  
 Tyr Glu Pro His Cys Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ser Pro Arg Asp Thr Ala Leu  
 20 25  
 <210> 57  
 <211> 222  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 与TNFRSF19跨膜结构域融合的CD8a铰链结构域  
 <400> 57  
 gggccgcgc cggccctcg gcccccgact cctgccccga cgatecttc ccaacctctc 60  
 tcgtgcgcc cggaagcatg ccggcccgcc gccggtggcg ctgtccacac tcgcggactg 120  
 gactttgata ccgcactggc ggccgtgate tgtagegccc tggccaccgt gctgctggcg 180  
 ctgctcatcc ttgcgtgat ctactgcaag cggcagccta gg 222  
 <210> 58  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 与TNFRSF19跨膜结构域融合的CD8a铰链结构域  
 <400> 58  
 [0028] Ala Ala Ala Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
 20 25 30  
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Asp Thr Ala Leu Ala Ala  
 35 40 45  
 Val Ile Cys Ser Ala Leu Ala Thr Val Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu  
 50 55 60  
 Cys Val Ile Tyr Cys Lys Arg Gln Pro Arg  
 65 70  
 <210> 59  
 <211> 123  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> CD28共刺激结构域  
 <400> 59  
 cggtcgaaga ggtccagact cttgcactcc gactacatga acatgactcc tagaaggccc 60  
 ggaccacta gaaagcacta ccagccgtac gccctctctc gggatttcgc cgcataccgg 120  
 tcc 123  
 <210> 60  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> CD28共刺激结构域

&lt;400&gt; 60

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

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

<223> CD3  $\zeta$  形式2

&lt;400&gt; 61

cgcgtgaaat ttageccgag cgcggatgcg ccggcgtatc agcagggcca gaaccagctg 60  
tataacgaac tgaacctggg ccgcgcgaa gaatatgatg tgctggataa acgccgcggc 120  
cgcgatccgg aaatgggagg caaacccgcg cgcaaaaacc cgcaggaagg cctgtataac 180  
gaactgcaga aagataaaat ggcggaagcg tatagcgaaa ttggcatgaa aggcgaacgc 240  
cgccgcggca aaggccatga tggcctgtat cagggcctga gcaccgcgac caaagatacc 300  
tatgatgcgc tgcatatgca ggcgctgccg ccgcgc 336

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

[0029]

&lt;220&gt;

<223> CD3  $\zeta$  形式2

&lt;400&gt; 62

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; 63

&lt;211&gt; 93

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 弗林蛋白酶P2A弗林蛋白酶

&lt;400&gt; 63

cgcggaac gcagcgag cgccgcgacc aacttagcc tgctgaaaca ggcggcgat 60

gtggaagaaa acccgggccc gcgagcaaag agg		93
<210> 64 <211> 31 <212> PRT <213> 人工		
<220> <223> 弗林蛋白酶P2A弗林蛋白酶		
<400> 64		
Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys 1 5 10 15		
Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Ala Lys Arg 20 25 30		
<210> 65 <211> 78 <212> DNA <213> 人工		
<220> <223> 弗林蛋白酶T2A		
<400> 65		
agagctaaac gctctgggtc tggatgaagga cgaggtagcc ttcctacgtg cggagacgtg		60
gaggaaaacc caggaccc		78
<210> 66 <211> 26 <212> PRT <213> 人工		
<220> <223> 弗林蛋白酶T2A		
<400> 66		
Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr 1 5 10 15		
Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro 20 25		
<210> 67 <211> 1005 <212> DNA <213> 人工		
<220> <223> 截短的EGFR (tEGFR) 标签		
<400> 67		
aggaagggtt gcaatggaat cggatatagg gagtttaagg attcacttag cataaacgct		60
actaatatta aacacttcaa aaactgtacg agtataagtg gagatcttca cttttgccg		120
gttgcaattcc gaggcgattc attcaccac acgccaccgc ttgaccaca agaattggat		180
attcttaaaa ccgttaaaga aataacgggg tttttgtcga ttcaagegtg gccagaaaat		240
cgactgacc tccatgcttt cgagaacctg gagattataa gaggacgaac taagcagcat		300
ggtcaattct cccttgctgt ggtcagcctg aacatcacca gtcttggttt gcggtccctc		360
aaggaaattt cagatggaga tgcacatata agcggaaca agaatttggt ctatgcaa		420
accataaact ggaaaaaact gtttggcact tccggccaga aaaccaagat tatttcaa		480
cggggtgaga acagctgcaa agccaccggc caggtttgct atgccttggt ctctccggaa		540
ggctgttggg ggccagaacc cagggaactgc gtcagttgca gaaacgtctc aagagccgc		600
gaatgcgttg acaagtgtaa cctccttgag ggtgagccac gagagtttgt tgagaacagc		660

[0030]

gagtggtatcac aatgtcaccc tgaatgtttg ccccaggteta tgaatataac ctgcacaggc 720  
 cgcgggacctg ataactgcat ccagtgtgct cattacatag atggacctca ctgtgtgaaa 780  
 acctgcccgg cgggagttat gggagaaaaac aacactctgg tgtggaaata cgctgatgca 840  
 ggccacgtgt gccacctttg tcacccgaat tgtacatag ggtgtaccgg tcttggaactt 900  
 gaaggttgcc ctaccaatgg ccctanaata cccagtatcg caactggcat ggtaggcgct 960  
 cttctcttgc tcttggtagt tgcctctggc ataggtcttt ttatg 1005

<210> 68  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 截短的EGFR (tEGFR) 标签

<400> 68

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 80

[0031]

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  
 145 150 155 160

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  
 225 230 235 240

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  
305 310 315 320

Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met  
325 330 335

<210> 69  
<211> 1080  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> LTG1927 (EF1a-CD33\_4-CD8 TM-CD28-CD3 ζ -cfrag)

<400> 69  
atgctgctgc tgggtgaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcattccggc gtttctgctg 60  
attccggagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg agggtccttg 120  
agactctect gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgag ctgggtccgc 180  
caggctccaa gacaagggtt tgagtgggtg gccaacataa agcaagatgg aagtgagaaa 240  
tactatgctg actcagttaa ggcccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300  
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacag ccacgtatta ctgtgcgaaa 360  
gaaantgtgg actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcggc cgcgactacc 420  
actctgcac caaggccacc taccacagcc cccaccattg caagccagcc actttcactg 480  
cgccccgaag cgtgtagacc agctgtgga ggagccgtgc atacccgagg gettgacttc 540  
gcctgtgaca tctacatctg ggccccattg gctggaactt gcggcgctgt gctcttgtct 600  
ctggtcatta cctgtactg ccggtcgaag aggtccagac tcttgcactc cgactacatg 660  
aacatgactc ctagaaggcc cggaccactc agaaagcact accagccgta cggccctcct 720  
cgggatttgc ccgcataccg gtccagagtg aagttcagcc gtcagccga tgcaccggcc 780  
taccagcagg gacagaacca gctctacaac gagtcaacc tgggtcggcg ggaagaatat 840  
gacgtgctgg acaaacggcg cggcagagat ccggagatgg ggggaaagcc gaggaggaag 900  
aaccctcaag agggcctgta caacgaactg cagaaggaca agatggcgga agcctactcc 960  
gagateggca tgaagggaga acgccggaga gggaagggtc atgacggact gtaccagggc 1020  
ctgtcaactg ccactaagga cacttacgat gcgtccata tgcaagcttt gccccgcgg 1080

<210> 70  
<211> 360  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> LTG1927 (EF1a-CD33\_4-CD8 TM-CD28-CD3 ζ -cfrag)

<400> 70

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
20 25 30

[0032]

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60  
 Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 85 90 95  
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 100 105 110  
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asn Val Asp Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro  
 130 135 140  
 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg  
 165 170 175  
 Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly  
 180 185 190  
 [0033] Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg  
 195 200 205  
 Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro  
 210 215 220  
 Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
 245 250 255  
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
 260 265 270  
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
 275 280 285  
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu  
 290 295 300  
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser  
 305 310 315 320  
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly  
 325 330 335  
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu  
 340 345 350  
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 355 360

<210> 71  
 <211> 1065  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> LTG\_D0033 (Efla\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28z)

<400> 71

```

atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcacccggc gtttctgctg      60
attccggagg tgcagctggg ggagctctgg ggagccttgg tacagcctgg agggtcctg      120
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgag ctgggtccgc      180
caggctccaa gacaagggct tgagtgggtg gccaacataa agcaagatgg aagtgagaaa      240
tactatgcgg actcagtga gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg      300
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacag ccacgtatta ctgtgcgaaa      360
gaaaatgtgg actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcggc cgcagtcgga      420
ttccaagaca tggaatgcgt gccctgcggc gaccgcgcac ctcttacga gccgcactgc      480
gcategaagg tcaacctcgt gaagatcgcg agcaccgcgt cctcaccctg ggatactgct      540
ctggccgcgc tgatttgctc cgccttgccc accgtgcttc tggccctgct gatcctctgt      600
gtgacccggg cgaagaggtc cagactcttg cactccgact acatgaacat gactcctaga      660
aggcccgagc ccactagaaa gcactaccag ccgtacgccc ctctcggga ttccgcgcga      720
taccggtcca gagtgaagtt cagccgtcca gccgatgcac cggcctacca gcaggacag      780
aaccagctct acaacgagct caacctgggt cggcgggaag aatatgacgt gctggacaaa      840
cggcgcggca gagatccgga gatgggggga aagccgagga ggaagaacct tcaagagggc      900
ctgtacaacg aactgcagaa ggacaagatg gcggaagcct actccgagat cggcatgaag      960
ggagaacgcc ggagagggaa gggctcatgac ggactgtacc agggcctgtc aactgccact     1020
aaggacactt acgatgcgt ccatatgcaa gctttgcccc cgcggg                        1065

```

[0034]

<210> 72  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>

<223> LTG\_D0033 (Efla\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28z)

<400> 72

```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1          5          10          15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20          25          30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35          40          45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg
50          55          60

Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
65          70          75          80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85          90          95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100         105         110

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asn Val Asp Trp Gly Gln Gly

```



	115	120	125
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Val Gly Phe Gln Asp Met 130 135 140		
	Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Pro Tyr Glu Pro His Cys 145 150 155 160		
	Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro 165 170 175		
	Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser Ala Leu Ala Thr Val 180 185 190		
	Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Arg Ser Lys Arg Ser Arg 195 200 205		
	Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro 210 215 220		
	Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala 225 230 235 240		
	Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr 245 250 255		
	Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg 260 265 270		
	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met 275 280 285		
[0035]	Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu 290 295 300		
	Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys 305 310 315 320		
	Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu 325 330 335		
	Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu 340 345 350		
	Pro Pro Arg 355		
	<210> 73 <211> 1068 <212> DNA <213> 人工		
	<220> <223> LTG_D0034 (Ef1a_CD33_4 VH TNFRSF19 H_TM_4-1BBz		
	<400> 73		
	atgetgetgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcacccggc gtttctgetg	60	
	attccggagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg agggtcctg	120	
	agactctcct gtgcagctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgag ctgggtccgc	180	
	caggctccaa gacaagggt ttagtggtg gccaacataa agcaagatgg aagtgagaaa	240	
	tactatgcgg actcagtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg	300	
	ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacag ccacgtatta ctgtgcgaaa	360	
	gaaaatgtgg actggggcca gggcacctg gtcaccgtct cctcagcggc cgcagtcgga	420	

```

ttccaagaca tggaaatgcgt gccctgcgcc gacccgccac ctccttacga gccgcactgc      480
gcacatgaagg tcaacctcgt gaagatcgcg agcaccgcgt cctcaccocg ggatactgct      540
ctggccgcgcg tgatttggtc cgccttgccc accgtgcttc tggccctgct gatcctctgt      600
gtgatcaaga ggggccggaa gaagctgctt tacatcttca agcagccgtt catgcggccc      660
gtgcagacga ctcaggaaga ggacggatgc tcgtgcagat tccctgagga ggaagagggg      720
ggatgcgaac tgagagtga gttcagccgc tcagccgatg caccggccta ccagcaggga      780
cagaaccagc tctacaacga gctcaacctg ggtcggcggg aagaatatga cgtgctggac      840
aaacggcgcg gcagagatcc ggagatgggg ggaaagccga ggaggaagaa cctcaagag      900
ggcctgtaca acgaactgca gaaggacaag atggcggaag cctactccga gatcgcatg      960
aagggagaac gccggagagg gaagggtcat gacggactgt accagggcct gtcaactgcc     1020
actaaggaca cttacgatgc gctccatatg caagctttgc ccccgcgg                     1068

```

<210> 74  
 <211> 356  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> LTG\_ D0034 (Efla\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_4-1BBz)

<400> 74

```

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20          25          30

```

[0036] Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
35 40 45

```

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg
50          55          60

```

```

Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
65          70          75          80

```

```

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85          90          95

```

```

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100         105         110

```

```

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asn Val Asp Trp Gly Gln Gly
115         120         125

```

```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Val Gly Phe Gln Asp Met
130         135         140

```

```

Glu Cys Val Pro Cys Gly Asp Pro Pro Pro Tyr Glu Pro His Cys
145         150         155         160

```

```

Ala Ser Lys Val Asn Leu Val Lys Ile Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro
165         170         175

```

```

Arg Asp Thr Ala Leu Ala Ala Val Ile Cys Ser Ala Leu Ala Thr Val
180         185         190

```

```

Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Cys Val Ile Lys Arg Gly Arg Lys Lys
195         200         205

```

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr  
 210 215 220  
 Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala  
 245 250 255  
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg  
 260 265 270  
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu  
 275 280 285  
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
 290 295 300  
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
 305 310 315 320  
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
 325 330 335  
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Arg  
 355

[0037]

<210> 75  
 <211> 2247  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> LTG\_ D0015 (Ef1a\_CD33\_4 VH CD8 BBz T2A tEGFR)

<400> 75  
 atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcacccggc gtttctgctg 60  
 attccggagg tgcagctggt ggagtctggg ggagccttgg tacagcctgg agggtccttg 120  
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgag ctgggtccgc 180  
 caggctccaa gacaagggtc tgagtgggtg gccaacataa agcaagatgg aagtggagaa 240  
 tactatgcgg actcagtga gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300  
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacag ccacgtatta ctgtgcgaaa 360  
 gaaaatgtgg actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcggc cgcaactacc 420  
 accctgccc ctcggcggc gactccggcc ccaaccatcg caagccaacc cctctccttg 480  
 cgccccgaag ctgcccggc ggccgcggtt ggagccgtgc ataccgggg gctggacttt 540  
 gcctgcgata tctacatttg gggcccgtg gccggcactt gcggcgtgct cctgctgtcg 600  
 ctggctcatc cctttactg caagaggggc cggagaagc tgetttacat cttaagcag 660  
 ccgttcacgc ggcctgtgca gacgactcag gaagaggacg gatgctctg cagattccct 720  
 gaggaggaag aggggggatg cgaactgcgc gtcaagttct cagggtccgc cgacgcccc 780  
 gcataatcac agggccagaa tcagctctac aacgagctga acctgggaag gagagaggag 840  
 tacgacgtgc tggacaagcg acgcgacgc gacccggaga tgggggggaa accacggcgg 900  
 aaaaaccctc aggaaggact gtacaacgaa ctccagaaag acaagatgc ggaagcctac 960  
 tcagaaatcg ggaagaagg agagcggagg aggggaaagg gtcacgacgg gctgtaccag 1020  
 ggactgagca ccgccactaa ggatacctac gatgccttgc atatgcaagc actccacc 1080

```

cggtctagag ctaaagctc tgggtctggt gaaggacgag gtagccttct tacgtgcgga 1140
gacgtggagg aaaacccagg accccgagcc aaacgaatgc tgctgcttgt tacaagcctt 1200
ttgctctgcg aactccccca tccagctttt ctcttgattc caaggaaggt ttgcaatgga 1260
atcggtatag gggagttaa ggattcactt agcataaacg ctactaatat taaacacttc 1320
aaaaactgta cgagtataag tggagatett cacattttgc eggttgcatc ccgagcgcat 1380
tcattcaccc acacgccacc gcttgaccca caagaattgg atattcttaa aaccgttaa 1440
gaaataacgg ggtttttgct cattcaagcg tggccagaaa atcgactga cctccatgct 1500
ttcgagaacc tggagattat aagaggacga actaagcagc atggtcaatt ctcccttgct 1560
gtggtcagcc tgaacatcac cagtcttggt ttgcggtccc tcaaggaaat ttcagatgga 1620
gatgtcatca taagcggcaa caagaatttg tgctatgcaa ataccataaa ctggaaaaaa 1680
ctgttttgca cttccggcca gaaaaccaag attatttcaa atcggggtga gaacagctgc 1740
aaagccaccg gccaggtttg tcatgccttg tgctctccgg aaggtgttg ggggccagaa 1800
cccagggact gctcagttg cagaaacgct tcaagggcc gcgaatgcgt tgacaagtgt 1860
aacctccttg agggtagacc acgagagttt gttgagaaca gcgagtgtat acaatgtcac 1920
cctgaatgtt tgccccaggc tatgaatata acctgcacag gccgcgggcc tgataactgc 1980
atccagtgtg ctcatcatat agatggacct cactgtgtga aaacctgccc gggcggagtt 2040
atgggagaaa acaacactct ggtgtgaaa tacgtgatg caggccacgt gtgccacctt 2100
tgtaaccgca attgtacata tgggtgtacc ggtcctggac ttgaaggttg cctaccaat 2160
ggccctaaaa taccagtat cgcaactggc atggtaggcg ctcttctctt gctcttggtg 2220
gttgctctcg gcatagtctt ttttatg 2247

```

[0038]

<210> 76  
 <211> 749  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> LTG\_ D0015 (Efla\_CD33\_4 VH CD8 BBz T2A tEGFR)  
 <400> 76

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
 20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 35 40 45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys  
 65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 100 105 110

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asn Val Asp Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro

130	135	140
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu 145	150	155 160
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg 165	170	175
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly 180	185	190
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys 195	200	205
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg 210	215	220
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro 225	230	235 240
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser 245	250	255
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu 260	265	270
Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg 275	280	285
Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln 290	295	300
Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr 305	310	315 320
Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp 325	330	335
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala 340	345	350
Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ser Arg Ala Lys Arg Ser Gly 355	360	365
Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu 370	375	380
Asn Pro Gly Pro Arg Ala Lys Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu 385	390	395 400
Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys 405	410	415
Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile 420	425	430
Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly 435	440	445
Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His 450	455	460
Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys 465	470	475 480

[0039]

Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr  
 485 490 495  
 Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys  
 500 505 510  
 Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser  
 515 520 525  
 Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile  
 530 535 540  
 Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys  
 545 550 555 560  
 Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly  
 565 570 575  
 Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser  
 580 585 590  
 Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg  
 595 600 605  
 Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu  
 610 615 620  
 Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His  
 625 630 635 640  
 [0040] Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly  
 645 650 655  
 Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys  
 660 665 670  
 Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val  
 675 680 685  
 Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn  
 690 695 700  
 Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn  
 705 710 715 720  
 Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu  
 725 730 735  
 Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met  
 740 745  
 <210> 77  
 <211> 2241  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> LTG\_D0016 (Ef1a CD33\_4 VH CD8 28z T2A tEGFR)  
 <400> 77  
 atgtgtgtgc tggtagaccag cctgtgtgtg tgcgaactgc cgcacccggc gttttgtgtg 60  
 attccggagg tgcagctggg ggagctctgg ggagccttgg tacagcctgg agggtcctg 120  
 agactctect gtgcagcttc tggattcacc ttcagtagct atggcatgag ctgggtccgc 180

[0041]

```

caggctccaa gacaagggtc tgagtgggtg gccaacataa agcaaatgg aagtgaagaa 240
tactatgcgg actcagtga gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300
ctgtatctgc aaaigaacag cctgagagcc gaggacacag ccacgtatta ctgtgcgaaa 360
gaaaatgtgg actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcggc cgcgactacc 420
actcctgcac caccggccacc taccacagcc cccaccattg caagccagcc actttcactg 480
cgccccgaag cgtgtagacc agctgctgga ggagccgtgc atacccgagg gctggacttc 540
gcctgtgaca tctacatctg ggccccattg gctggaactt gcggcgtgct gctcttgtct 600
ctggtcatta cctgtactg ccggtcgaag aggtccagac tcttgcactc cgactacatg 660
aacatgactc ctagaaggcc cggaccactc agaaagcact accagccgta cggccctcct 720
cgggatttgc ccgcataccg gtcagagtg aagttcagcc gtcagccga tgcaccggcc 780
taccagcagg gacagaacca gctctacaac gagctcaacc tgggtcggcg ggaagaatat 840
gacgtgctgg acaaacggcg cggcagagat ccggagatgg ggggaaagcc gaggagggaag 900
aacctcaag agggcctgta caacgaactg cagaaggaca agatggcgga agcctactcc 960
gagatcgcca tgaagggaga acgcccggga gggaagggtc atgacggact gtaccagggc 1020
ctgtcaactg cactaagga cacttacgat gcctccata tgcaagcttt gcccccgagg 1080
agagctaaac gctctgggtc tggtaagga cgaggtagcc tctttacgtg cggagacgtg 1140
gaggaaaacc caggaccccg agccaaacga atgctgctgc ttgttacaag ccttttgctc 1200
tgcgaaactc cccatccagc ttttctctg attccaagga aggtttgcaa tggaaatcgt 1260
ataggggagt ttaaggattc acttagcata aacgctacta atattaaaca cttcaaaaac 1320
tgtacagta taagtggaga tcttcacatt ttgcgggtg cattccgagg cgattcattc 1380
acccacacgc caccgctga cccacaagaa ttgatattc ttaaaaccgt taaagaata 1440
acggggtttt tgctattca agcgtggcca gaaaatcgca ctgacctcca tgctttcgag 1500
aacctggaga ttataagagg acgaactaag cagcatggtc aattctccct tgctgtggtc 1560
agcctgaaca tcaccagtct tggtttgcgg tccctcaagg aaatttcaga tggagatgtc 1620
atcataagcg gcaacaagaa ttgtgtctat gcaaatacca taaactggaa aaaactgttt 1680
ggcacttcgc gccagaaaac caagattatt tcaaatcggg gtgagaacag ctgcaaagcc 1740
accggccagg tttgtcatgc cttgtgctct ccggaaggct gttgggggcc agaaccagg 1800
gactgcgtca gttgcagaaa cgtctcaaga ggccgcgaat gcgttgacaa gtgtaacctc 1860
cttggagggt agccacagaa gttgtttgag aacagcgagt gtatacaatg tcacctgaa 1920
tgtttgcccc aggetatgaa tataacctgc acaggccgcg ggcctgataa ctgcatccag 1980
tgtgtcatt acatagatgg acctactgt gtgaaaacct gcccggccgg agttatggga 2040
gaaaacaaca ctctggtgtg gaaatacgtt gatcaggcc acgtgtgcca cctttgtcac 2100
ccgaattgta catatgggtg taccggtcct ggacttgaag gttgccctac caatggccct 2160
aaaaatccca gtaicgaac tggcatgta ggcgctcttc tcttgctctt ggtagttgt 2220
ctcggcatag gctttttat g 2241

```

<210> 78  
<211> 747  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> LTG\_D0016 (Ef1a CD33\_4 VH CD8 28z T2A tEGFR)

<400> 78

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

[0042]

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
 20 25 30  
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60  
 Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 85 90 95  
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 100 105 110  
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asn Val Asp Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro  
 130 135 140  
 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg  
 165 170 175  
 Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly  
 180 185 190  
 Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg  
 195 200 205  
 Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro  
 210 215 220  
 Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
 245 250 255  
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
 260 265 270  
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
 275 280 285  
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu  
 290 295 300  
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser  
 305 310 315 320  
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly  
 325 330 335  
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu  
 340 345 350  
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly



	355	360	365
	Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro 370 375 380		
	Gly Pro Arg Ala Lys Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu 385 390 395 400		
	Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys 405 410 415		
	Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala 420 425 430		
	Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu 435 440 445		
	His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro 450 455 460		
	Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile 465 470 475 480		
	Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu 485 490 495		
	His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His 500 505 510		
	Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly 515 520 525		
[0043]	Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly 530 535 540		
	Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe 545 550 555 560		
	Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn 565 570 575		
	Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu 580 585 590		
	Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val 595 600 605		
	Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu 610 615 620		
	Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu 625 630 635 640		
	Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp 645 650 655		
	Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys 660 665 670		
	Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys 675 680 685		
	Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr 690 695 700		

	Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro 705 710 715 720	
	Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu 725 730 735	
	Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met 740 745	
	<210> 79 <211> 36 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 79 gagagcaaat acgggcgcgc atgtcccccg tgtccg	36
	<210> 80 <211> 12 <212> PRT <213> 智人	
	<400> 80 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro 1 5 10	
	<210> 81 <211> 327 <212> DNA <213> 智人	
	<400> 81 gcaccaccag ttgttgcccc tagtgtcttc ttgttccctc ccaagcccaa agacaccttg atgatttcca gaactcctga ggttacctgc gttgtcgtag atgtttctca ggaggaccca gaggtccaat ttaactggta cgttgatggg gtggaagttc acaatgcgaa gacaaagccg cgggaagaac aatttcagtc cacttaccgg gttgtcagcg ttctgacggt attgcatcaa gactggctta atggaaagga atataagtggt aagggtgtcca acaaagggtt gccgagcagt attgagaaga ccatatcaaa ggcgaag	60 120 180 240 300 327
[0044]	<210> 82 <211> 109 <212> PRT <213> 智人	
	<400> 82 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro 1 5 10 15	
	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val 20 25 30	
	Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val 35 40 45	
	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln 50 55 60	
	Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln 65 70 75 80	
	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly 85 90 95	
	Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	

	100	105	
	<210> 83 <211> 321 <212> DNA <213> 智人		
	<400> 83 gggcagccgc gcgagccaca agtttacact ttgccgccat ctcaagagga aatgactaaa 60 aaccaggat ccttgacatg cctcgtaaaa ggattttatc catctgatat tgcgtggaa 120 tgggagtcta acgggcagcc ggaaaataat tacaaaacta caccacctgt gctcgattca 180 gatggaagtt tcttcttta cagtagactt acggtggaca aatctagggt gcaggaaggg 240 aatgtgttta gttgtagtgt aatgcacgag gcacttcata accactatac acagaagtca 300 ctgagtttga gtcttggcaa a 321		
	<210> 84 <211> 107 <212> PRT <213> 智人		
	<400> 84 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu 1 5 10 15 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe 20 25 30 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu 35 40 45 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe 50 55 60 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly 65 70 75 80 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr 85 90 95 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 100 105		
[0045]	<210> 85 <211> 684 <212> DNA <213> 智人		
	<400> 85 gagagcaaat acgggcgcgc atgtcccccg tgtccggcac caccagttgc tggccctagt 60 gtcttcttgt tccctcccaa gcccaaagac accttgatga tttccagaac tectgaggtt 120 acctgcgttg tcgtagatgt ttctcaggag gaccagagg tccaatttaa ctggtacgtt 180 gatggggtgg aagttcacia tgcgaagaca aagccgcggg aagaacaatt tcagtccact 240 taccgggttg tcagcgttct gacggtattg catcaagact ggcttaatgg aaaggaatat 300 aagtgttaagg tgtccaacia aggtttgccg agcagtattg agaagaccat atcaaaggcg 360 aaggggcagc cgcgcgagcc acaagtttac acttggccgc catctcaaga ggaatgact 420 aaaaaccagg tacccttgac atgcctcgtc aaaggatttt atccatctga tattgtgtg 480 gaatgggagt ctacgggca gccgaaaaa aattacaaaa ctacaccacc tgtgtcgtat 540 tcagatggaa gtttcttctt ttacagtaga ctacgggtgg acaaatctag gtggcaggaa 600 gggaatgtgt ttagtgttag tgtaatgcac gaggcacttc ataaccacta tacacagaag 660		

tcactgagtt tgagtcttgg caaa

684

<210> 86  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> 智人

&lt;400&gt; 86

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val  
 1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 35 40 45

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr  
 65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
 100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 115 120 125

[0046]

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
 180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 210 215 220

Ser Leu Gly Lys  
 225

<210> 87  
 <211> 1629  
 <212> DNA  
 <213> 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; LTG\_D0035 (Ef1a\_CD33\_4 VH H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28z)

&lt;400&gt; 87

atgctgctgc tggtaaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcacccggc gtttctgctg 60

attccggagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg agggteccctg 120

agactctcct gtgcagctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgag ctgggtccgc 180

caggctccaa gacaagggtc tgagtgggtg gccaacataa agcaagatgg aagtgaagaa 240  
 tactatgcgg actcagtga gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300  
 ctgtatctgc aaaigaacag cctgagagcc gaggacacag ccacgtatta ctgtgcgaaa 360  
 gaaaatgtgg actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcggc cgcagagagc 420  
 aaatacgggc cgccatgtcc cccgtgtccg gcaccaccag ttgctggccc tagtgtcttc 480  
 ttgttccctc ccaagcccaa agacaccttg atgatttcca gaactcctga ggttacctgc 540  
 gttgtcgtag atgtttctca ggaggaccca gaggccaat ttaactggta cgttgatggg 600  
 gtggaagttc acaatgcgaa gacaagccg cgggaagaac aatttcagtc cacttacccg 660  
 gttgtcagcg ttctgacggt attgcatcaa gactggotta atggaaagga atataagtgt 720  
 aaggtgtcca acaaagttt gccgagcagt attgagaaga ccatacaaaa ggcgaagggg 780  
 cagccgcgcg agccacaagt ttacactttg ccgccatctc aagaggaaat gactaaaaac 840  
 caggtatcct tgacatgcct cgtaaaagga ttttatccat ctgatattgc tgtggaatgg 900  
 gagtctaacg ggcagccgga aaataattac aaaactacac caccgtgtct cgattcagat 960  
 ggaagtttct tcctttacag tagacttacg gtggacaaat ctaggtggca ggaagggaat 1020  
 gtgttttagtt gtagtgtaat gcacgagcca cttcataacc actatacaca gaagtcactg 1080  
 agtttgagtc ttggcaaaat ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt 1140  
 ctctgtcac tggttatcac cctttactgc cggtcgaaga ggtccagact cttgcactcc 1200  
 gactacatga acatgactcc tagaaggccc ggaccacta gaangcacta ccagccgtac 1260  
 gccccctcct gggatttcgc cgcataccgg tcagagtga agttcagccg ctcagccgat 1320  
 gcaccggcct accagcaggg acagaaccag ctctacaacg agctcaacct gggtcggcgg 1380  
 gaagaaatag acgtgctgga caaacggcgc ggcagagatc cggagatggg gggaaagccg 1440  
 aggaggaaga accctcaaga gggcctgtac aacgaactgc agaaggacaa gatggcggaa 1500  
 gcctactccg agatcgccat gaaggagaaa gcgcggagag ggaagggtca tgacggactg 1560  
 taccagggcc tgtcaactgc cactaaggac acttacgatg cgctccatat gcaagctttg 1620  
 cccccgcgg 1629

[0047]

<210> 88  
 <211> 543  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> LTG\_D0035 (Ef1a\_CD33\_4 VH H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28z)

<400> 88

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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
 20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 35 40 45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys  
 65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 85 90 95

[0048]

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 100 105 110  
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asn Val Asp Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
 130 135 140  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 165 170 175  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 180 185 190  
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 195 200 205  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 210 215 220  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 225 230 235 240  
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 245 250 255  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 260 265 270  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 275 280 285  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 290 295 300  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 305 310 315 320  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 325 330 335  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 340 345 350  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr  
 355 360 365  
 Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu  
 370 375 380  
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His  
 405 410 415  
 Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg  
 420 425 430  
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

	435	440	445
	Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp 450 455 460		
	Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro 465 470 475 480		
[0049]	Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp 485 490 495		
	Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg 500 505 510		
	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr 515 520 525		
	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg 530 535 540		

A	前导肽	抗CD33结合物	CD8 铰链	CD8 TM	4-1BB	CD3z		
B	前导肽	抗CD33结合物	CD8 铰链	CD8 TM	CD28	CD3z		
C	前导肽	抗CD33结合物	TNFRSF19铰链	TNFRSF19 TM	4-1BB	CD3z		
D	前导肽	抗CD33结合物	TNFRSF19铰链	TNFRSF19 TM	CD28	CD3z		
E	前导肽	抗CD33结合物	CH2CH3 IgG4 铰链	CD8 TM	CD28	CD3z		
F	前导肽	抗CD33结合物	CD8 铰链	CD8 TM	4-1BB	CD3z	2A	tEGFR
G	前导肽	抗CD33结合物	CD8 铰链	CD8 TM	CD28	CD3z	2A	tEGFR

图1



LTG 1905 EF1a VH-2 CD33 -CD8 TM-41BB-CD3 核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG  
AGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATG  
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCAT  
AGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATCTCCAGAGAC  
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCC  
ACGTATTACTGTGCGAGACCCCTCAACTACTACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCA  
AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGC  
CGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTG  
CCGCCCCGGCCGCGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATAT  
CTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATC  
ACCTTTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTT  
ATGCGGCCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAG  
GAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCC  
GCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGA  
GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAAC  
CACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATG  
GCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCA  
CGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCA  
TATGCAAGCACTCCCACCCCG

LTG 1905 EF1a VH-2 CD33 -CD8 TM-41BB-CD3 氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMS  
WVRQAPRKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYY  
CARPLNYYYYYMDVWGKTTVTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG  
GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ  
EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG  
RDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT  
KDTYDALHMQALPPR

图2A

LTG 1906 EF1a- VH-4 CD33 -CD8 TM-41BB-CD3  $\zeta$

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG  
AGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATG  
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCA  
AGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG  
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC  
AGCCACGTATTACTGTGCGAAAGAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAC  
CGTCTCCTCAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCA  
ACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGGT  
GGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGC  
TGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAG  
GGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAGAC  
GACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGAT  
GCGAACTGCGCGTCAAGTTCTACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCC  
AGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTG  
GACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCC  
TCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAG  
AAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAG  
GGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCAATATGCAAGCACTCCCA  
CCCCGG

LTG 1906 EF1a- VH-4 CD33 -CD8 TM-41BB-CD3  $\zeta$ 氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMS  
WVRQAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAT  
YYCAKENVDWGQGTITVSSAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT  
RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEM  
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD  
ALHMQALPPR

图2B

LTG1936 EFla ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ核苷酸序列

```
ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT
TCTGCTGATTCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCAGAGGTGAAAAAGCCCGG
GGAGTCTCTGAGGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATTTCAGTTTTCCACCTACTGGATC
GGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCT
GGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCC
GACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACC
GCCATGTATTACTGTGCGAGACTAGTTGGAGATGGCTACAATACGGGGGCTTTTGAT
ATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGT
GGCGGTAGCGGTGGTGGCGGATCCGATATTGTGATGACCCACACTCCACTCTCTCTGT
CCGTACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCA
TAGTAATGGAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACA
GCTCCTGATCTATGGAGCTTCCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGACAGGTTTCAGTGGC
AGCGGGTCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTT
GGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAGCTTCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACAC
GACTGGAGATTAAAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGACTCCGG
CCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGC
GGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGC
CCCCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCTTTACTGC
AAGAGGGGGCCGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTG
CAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGG
GGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACA
GGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACG
TGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAA
AACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTA
CTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGT
ACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCAATGCAAGCAC
TCCCACCCCGG
```

图2C

LTG1936 (EF1a ScFv9 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 氨基酸序列)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGFSFPTYWIG  
WVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY  
YCARLVGDGYNTGAFDIWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTH TPLSLSVTP  
GQPASISCKSSQSLLHSNGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYGASNRFSGVPDRFSGSGSGTDF  
TLKISRVEAEDVG VYYCMQSIQLPITFGQGTRLEIKAAATTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRP  
EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF  
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGL  
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

图2C (续)

LTG1937 EF1a ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTC  
GCAGACCCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACACTGCT  
GCTTGGAACCTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACA  
TACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTCCCTGTGAAAAGTCGAATAACC  
ATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCG  
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAAACGTATTACTATGGTTCGGGGAGTT  
ATTGGGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGAG  
GTGGCGGGTCTGGTAGTGGCGGTAGCGGTGGTGGCGGATCCCAGTCTGTCTGACGC  
AGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAA  
GCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGCACGG  
CCCCAAACTCTTCATCTATAAAAATAATCAGCGGCCCTCAGAGGTCCCTGACCGATT  
CTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAC  
GATGAGGCTGACTACTACTGTGCAGCATGGGATGACAGGCTGAATGGATATGTCTTC  
GGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGG  
CCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTT  
GCCGCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATA  
TCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGTCTCCTGCTGTCTGCTGGTCAT  
CACCTTTTACTGCAAGAGGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGT  
CATGCGGCCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGA  
GGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCC  
CGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAG  
AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAA  
CCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGAT  
GGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTC  
ACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGC  
ATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

图2D

LTG1937 EF1a ScFv10 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNTAA  
WNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVPVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT  
AVYYCARETYYYGSGSYWDAFDIWGQGTTTVTVSSGGGGSGSGGSGGGGSQSVVTQPPS  
VSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLFYKNNQRPSEVPDRFSGSKSGT  
SASLAISGLQSDDEADYYCAAWDDRLNGYVFGTGTKVTVLAAATTTTPAPRPPTPAPTAS  
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL  
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG  
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

图2D (续)



LTG1938 EFla ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ核苷酸序列

```
ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT
TCTGCTGATTCCGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTC
GCAGACCCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCT
GCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAGGGACA
TACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAATT
ATCAACGCAGACACATCGAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCC
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGATAATTACTATGATAGTACCGACTGG
TTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGCGGGTCT
GGTGGTGGCGGTAGCGGTGGTGGCGGATCCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCAACT
GTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGA
AGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTATC
TATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCA
GGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTAT
TACTGTTCTCTCCCGGGACGGCAGTGGTCATCCATATCTCTTCGGACCTGGGACCAAGG
TCACCGTTCTTGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCC
AACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGG
TGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCC
CTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGA
GGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAGA
CGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGA
TGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGC
CAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCT
GGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAAC
CCTCAGGAAGGACTGTACAACGAAC'TCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTC
AGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACC
AGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGATATGCAAGCACTCC
CACCCCGG
```

图2E

LTG1938 EF1a ScFv12 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAA  
WNWIRQSPSRGLEWLGGTYRYSKQWYNDYAVSVKSRIINADTSKNQFSLQLNSVTPEDT  
AVYYCARGYYDSTDWFDPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPTVSVA  
LGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTI  
TGAQAEDEADYYCSSRDGSGHPYLFPGTKVTVLAAATTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRP  
EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF  
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL  
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

图2E (续)



LTG1939 EF1a ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT  
TCTGCTGATTCCGGAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGG  
GGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATC  
GGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCT  
GGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTACCATCTCAGCC  
GACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACC  
GCCATGTATTACTGTGCGAGACTGACTACGGCTGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAA  
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGTGGCGGTAGCGGT  
GGTGGCGGATCCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTG  
GACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAA  
ACACCTACTTGAGTTGGCTTCACCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATGT  
ATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGGTCACAGACAGATTCAGTGGCAGCGGGTCAG  
GGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT  
ACTGCATGCAAGGTATACACCTACCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGA  
TCAAAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCA  
TCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGGTGGAG  
CCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGC  
CGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGC  
CGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACT  
CAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGA  
ACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAA  
TCAGTCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACA  
AGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAG  
GAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAAT  
CGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGA  
CTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCC  
CGG

图2F

LTG1939 EF1a ScFv15 CD33 CD8 TM-41BB-CD3 ζ氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG  
WVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY  
YCARLTTAGGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPLSLPVTLGQPAS  
ISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLHQRPGQPPRLLMYKISNRFSGVTD RFSGSGSGTDFTLKIS  
RVEAEDVG VYYCMQGIHLPLTFGGG TKLEIKAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC  
RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP  
VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQG  
LSTATKDTYDALHMQALPPR

图2F (续)

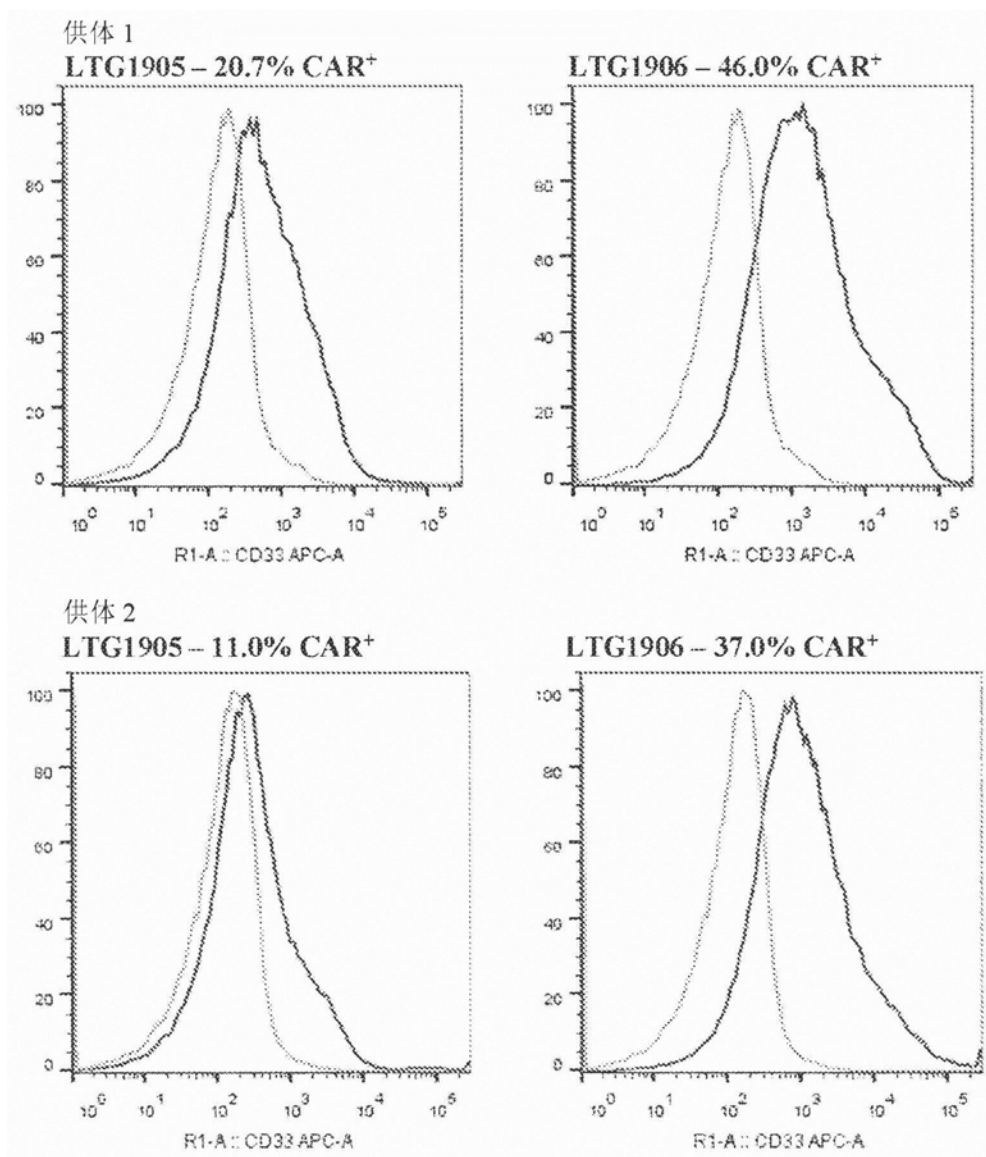


图3

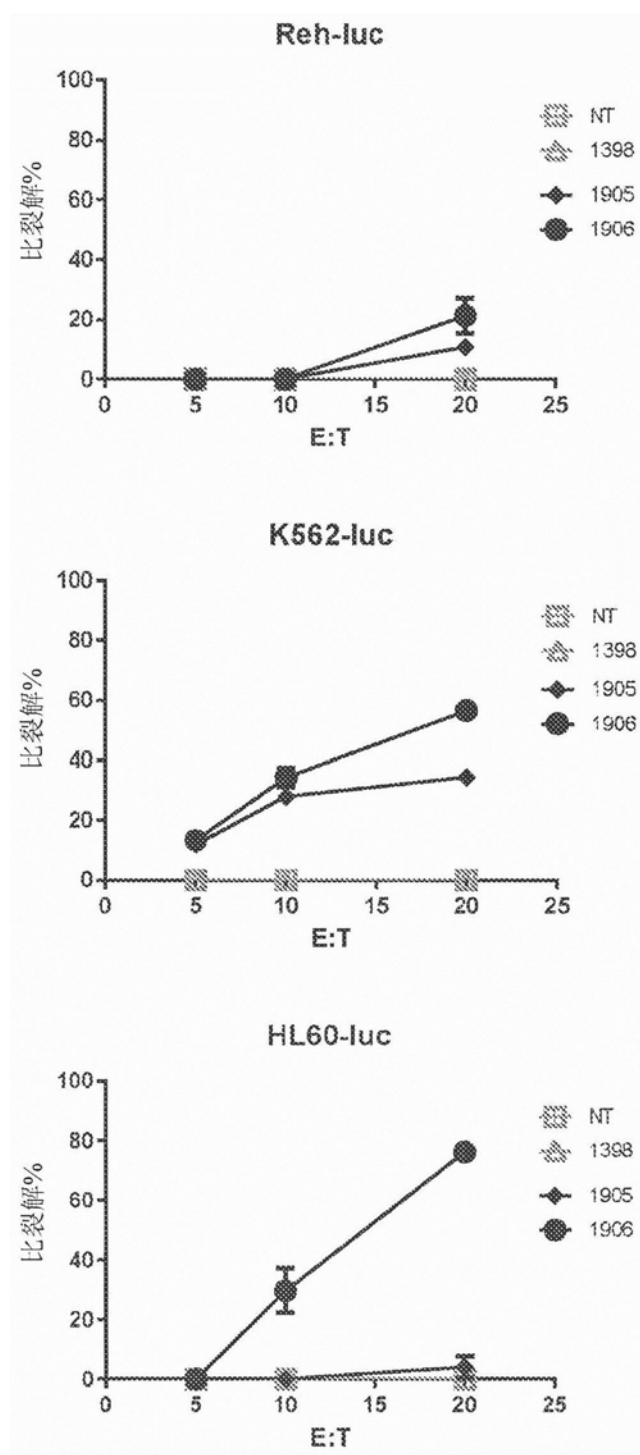


图4

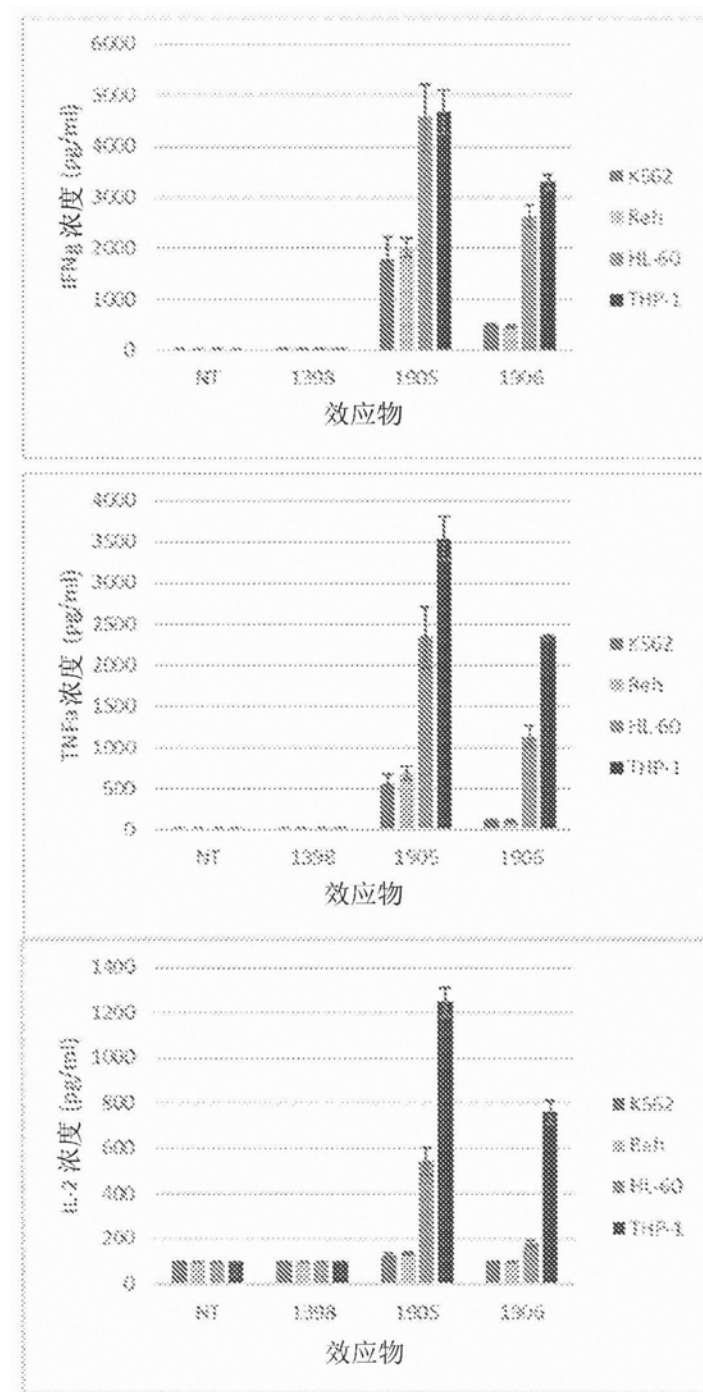


图5

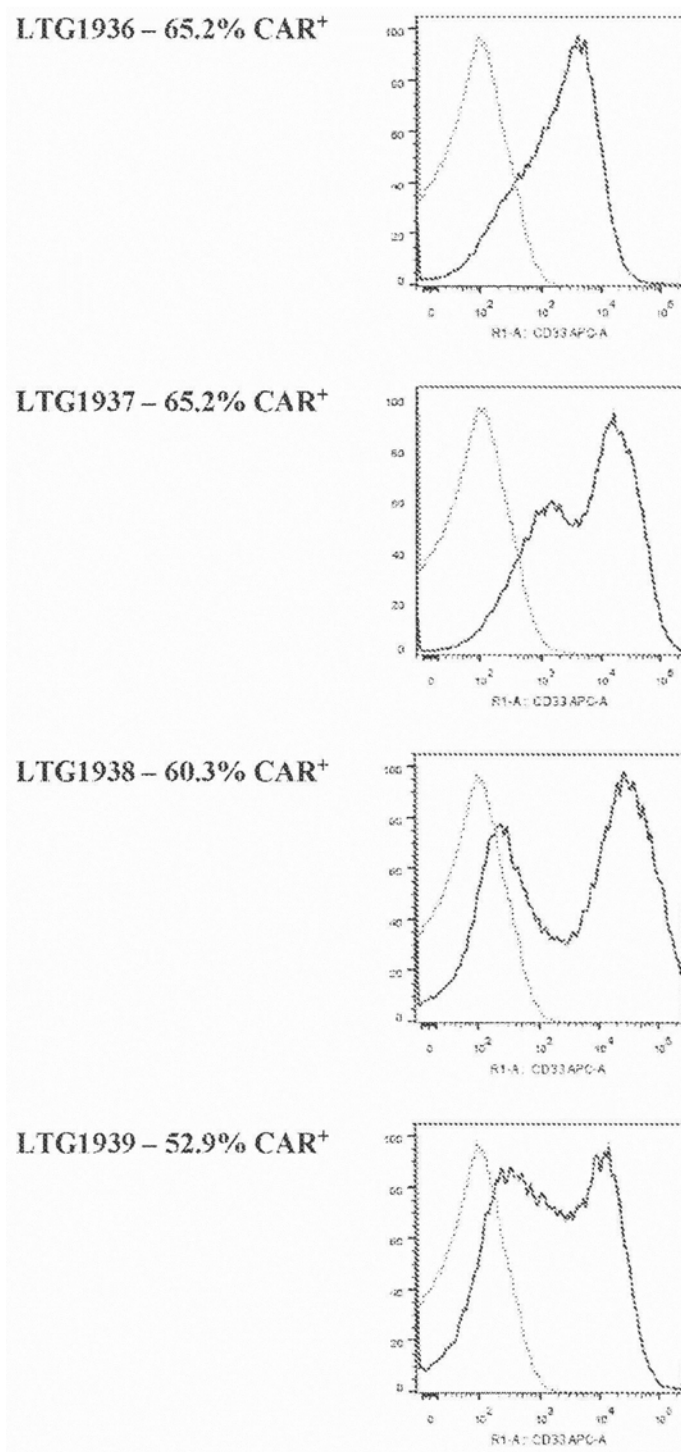


图6

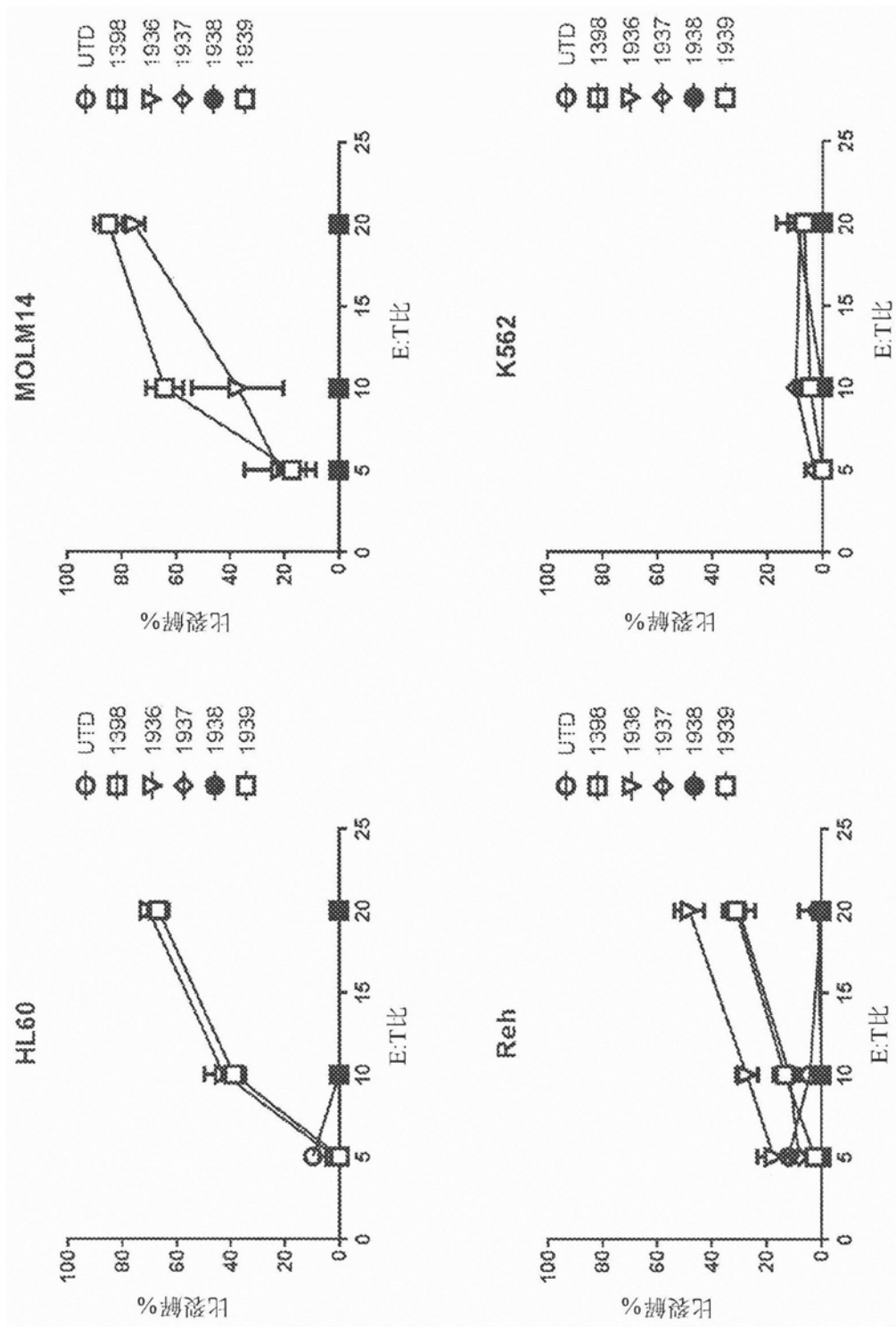


图7

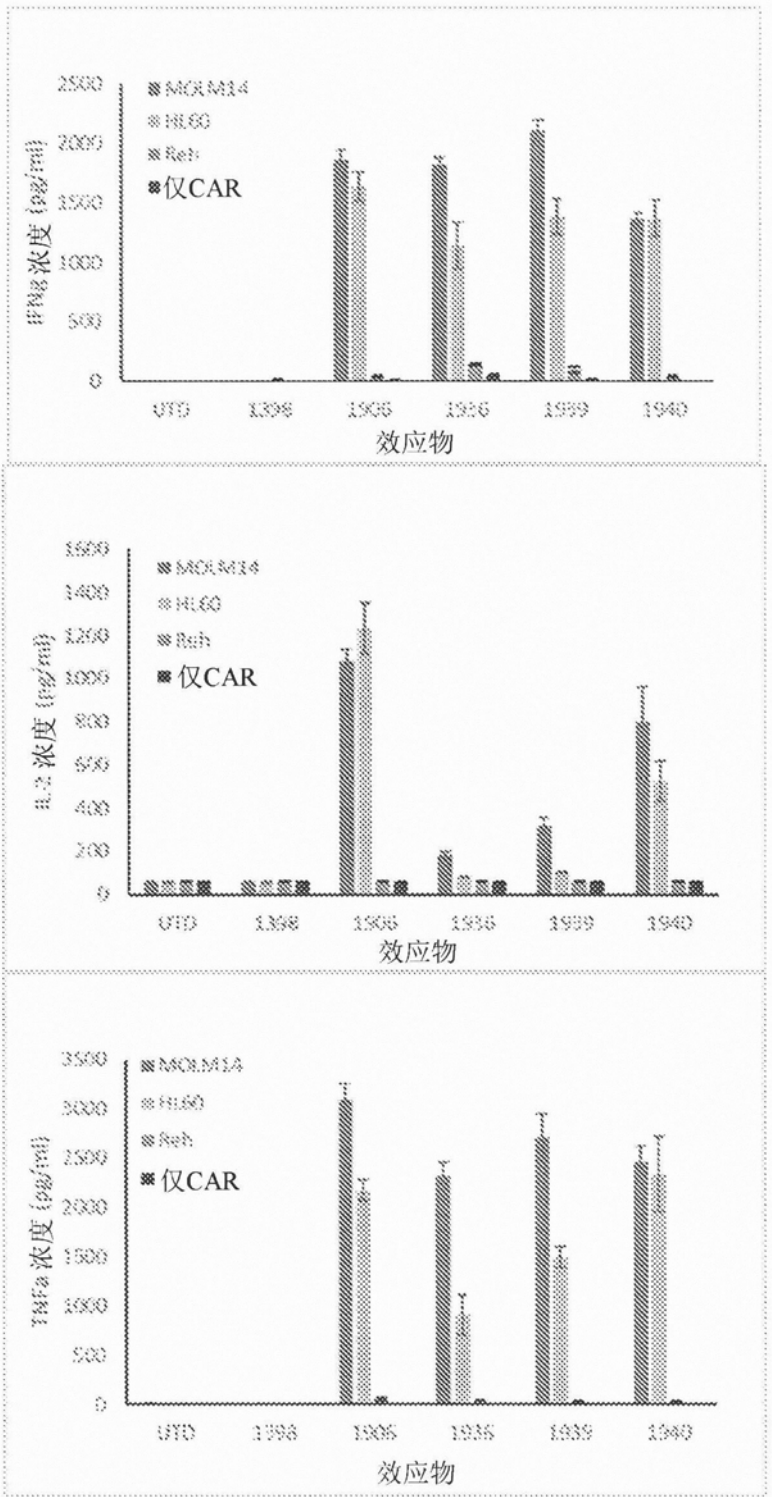


图8



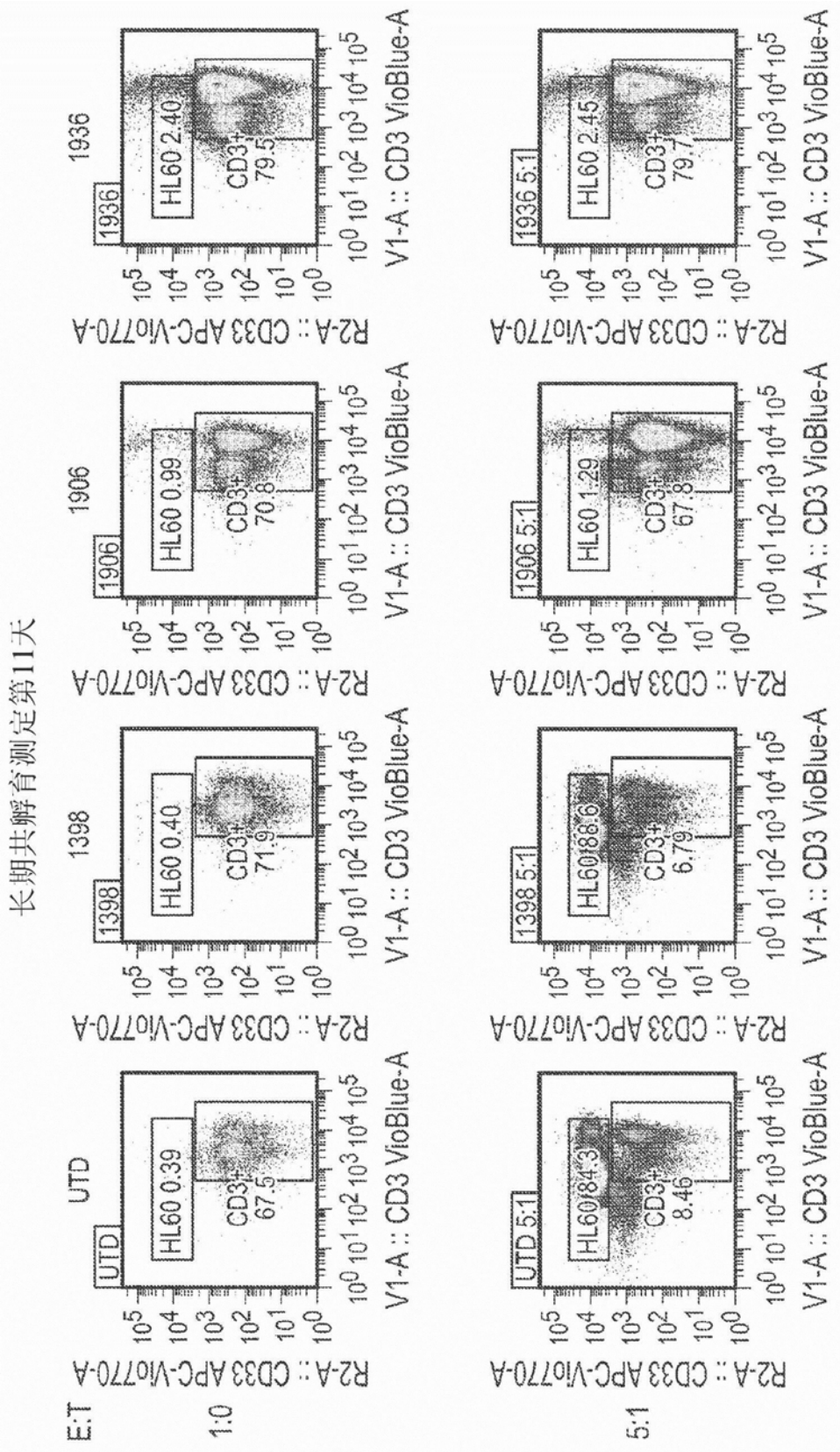


图9

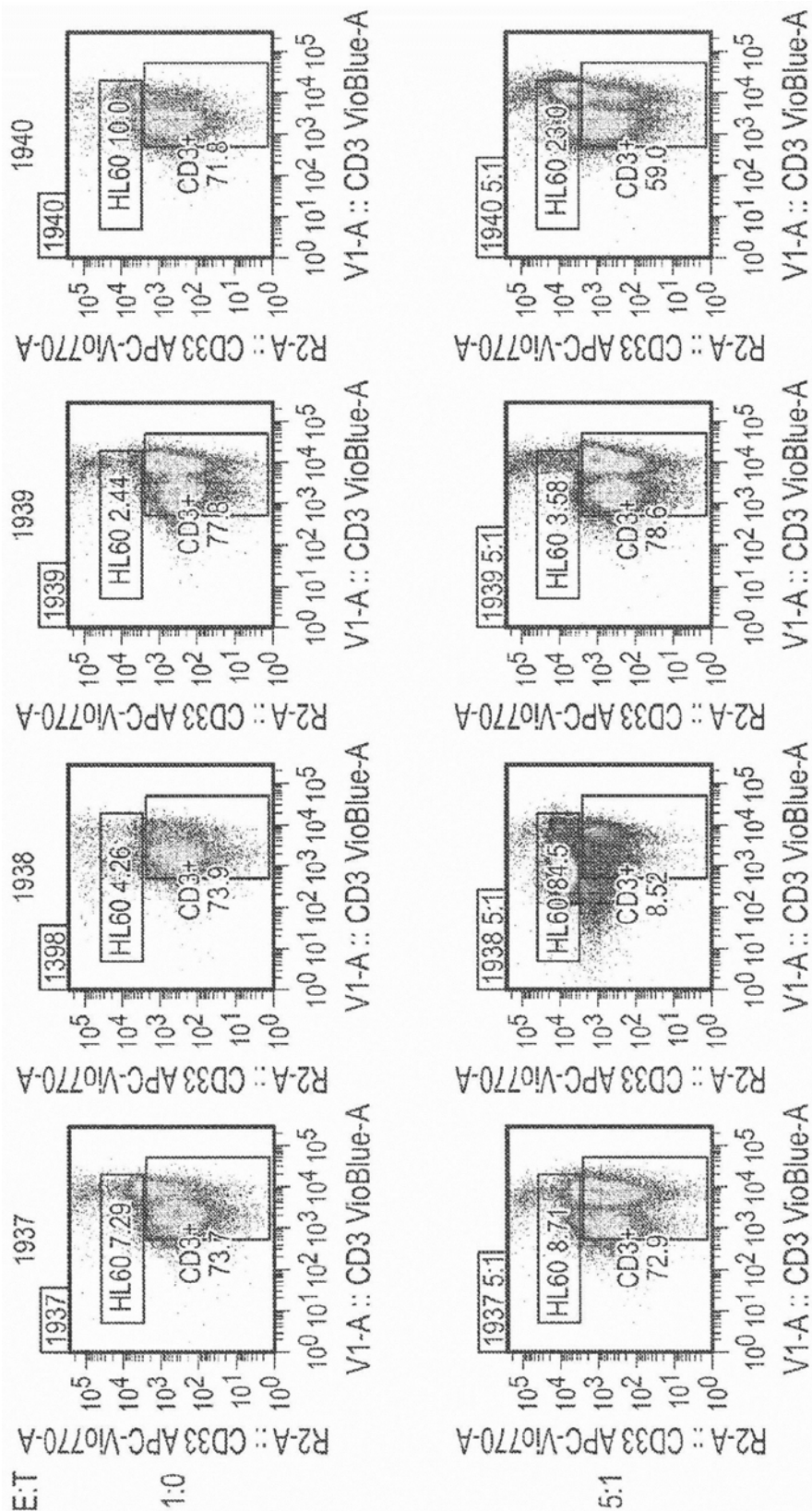


图9(续)

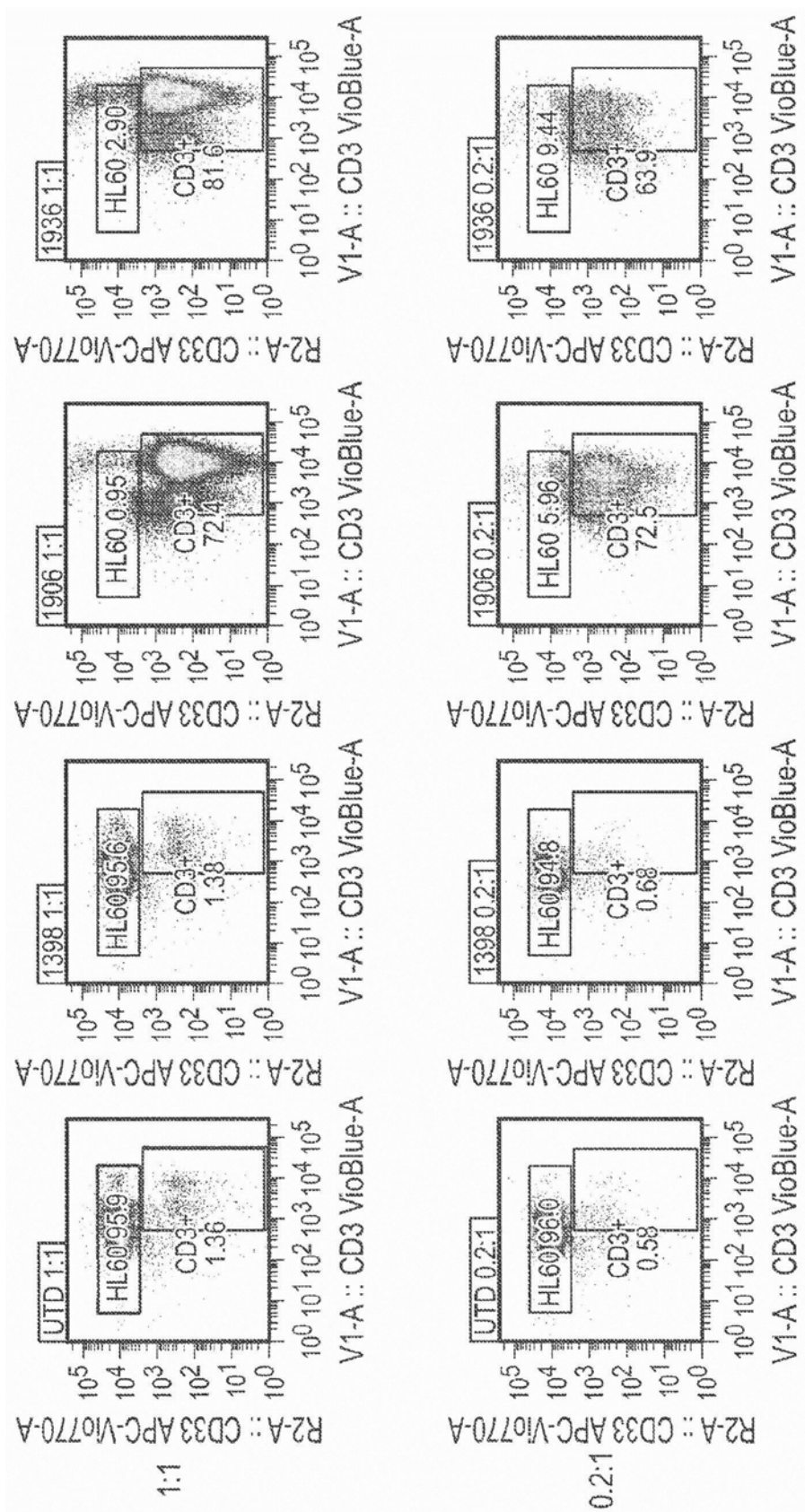


图9(续)

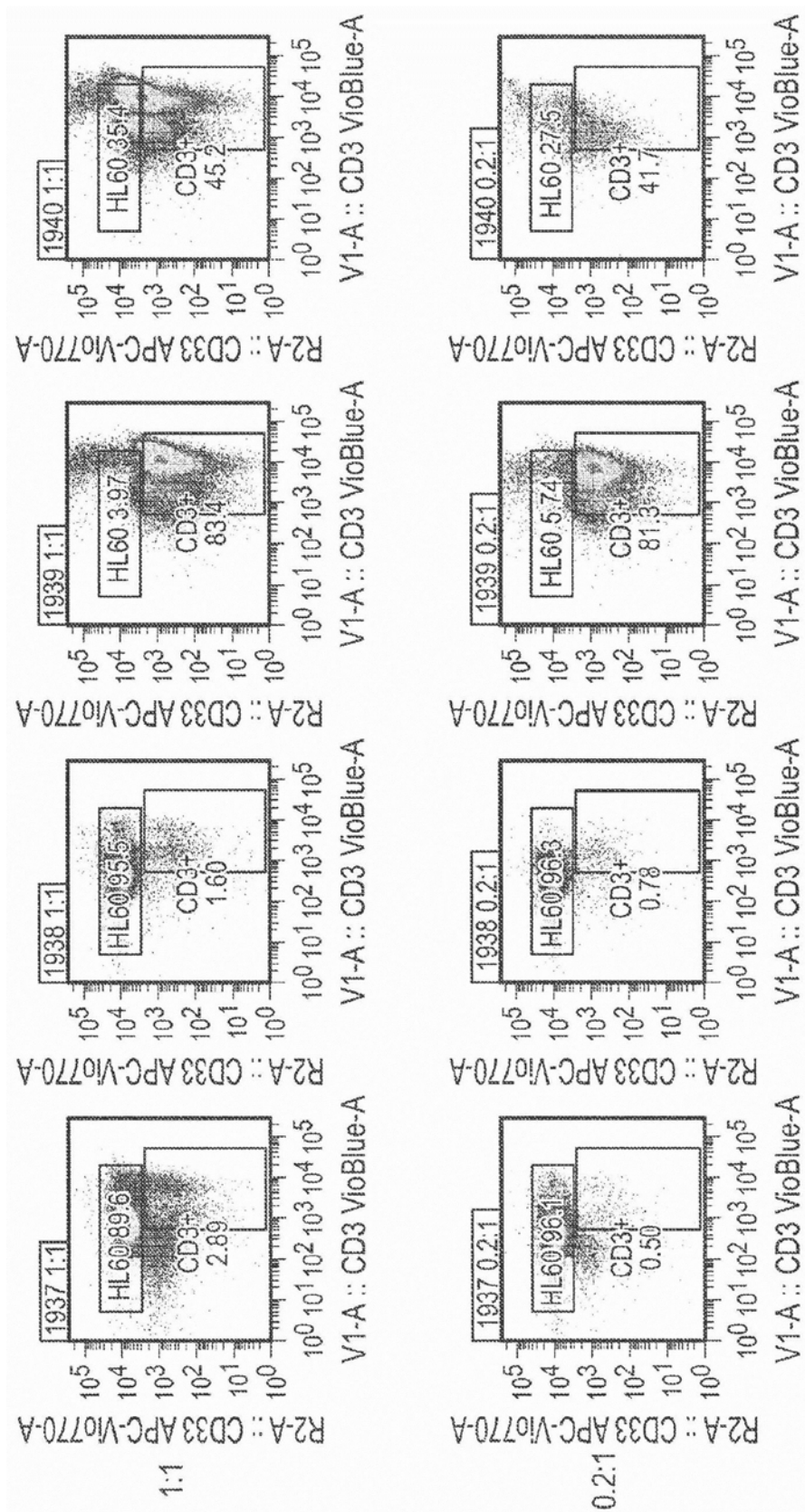


图9(续)

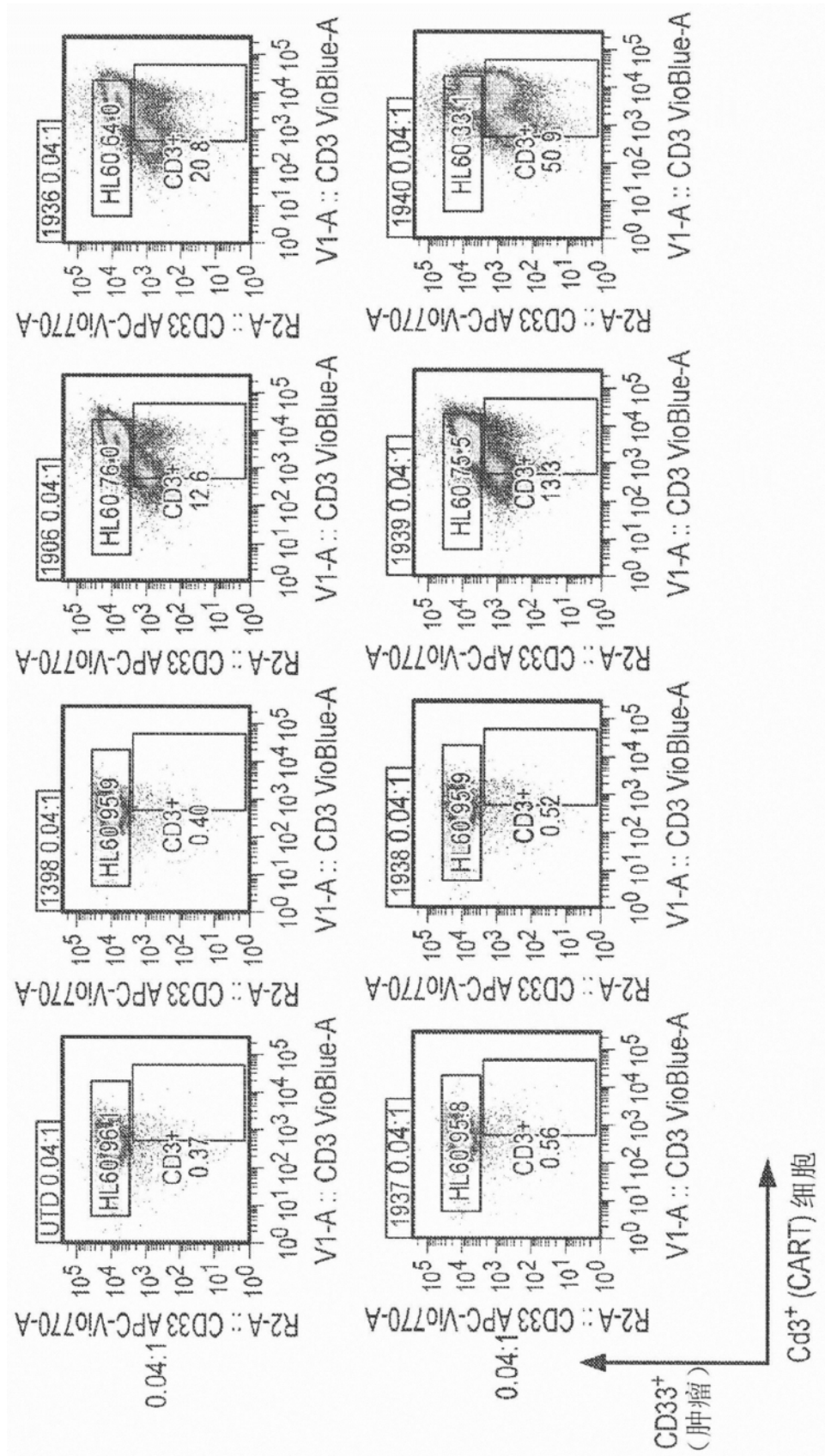


图9(续)



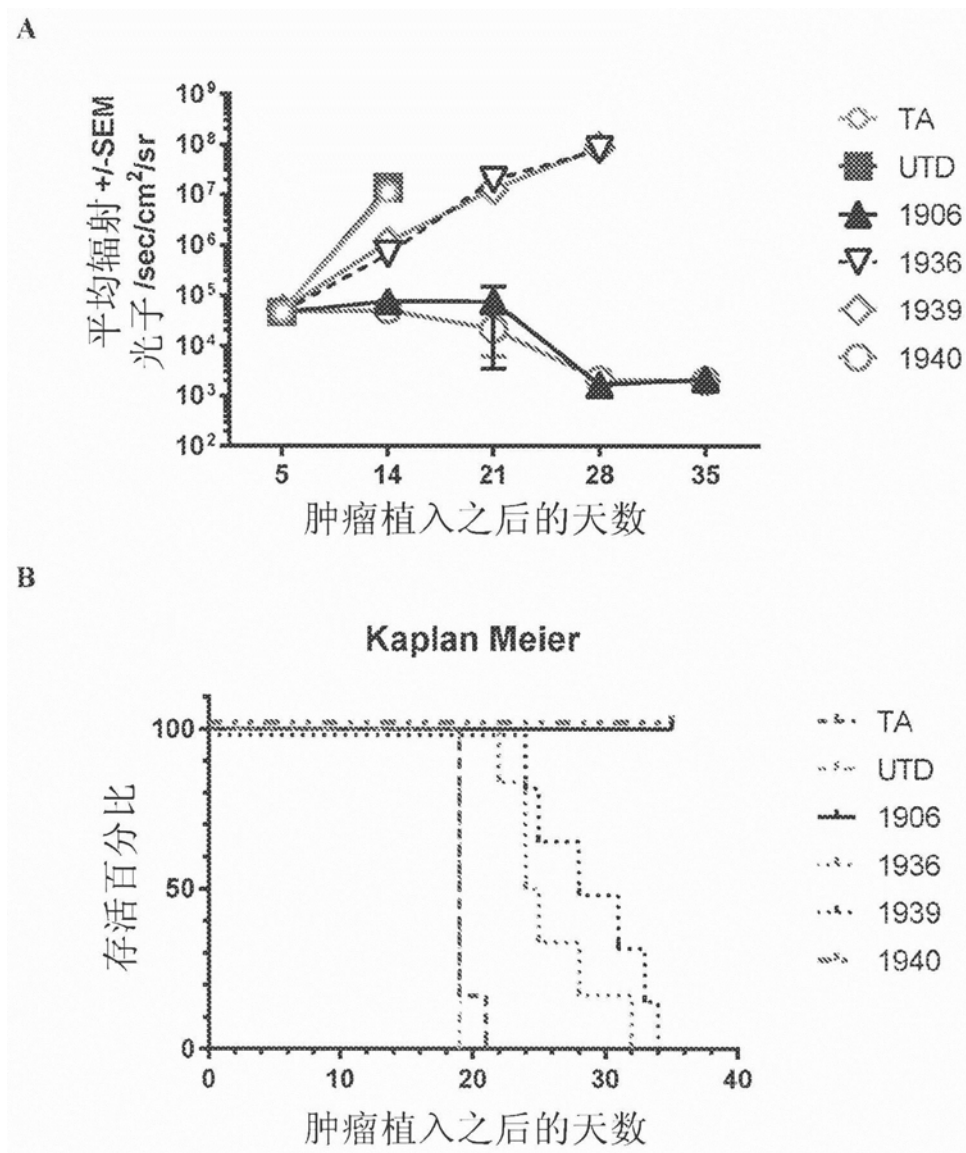


图10

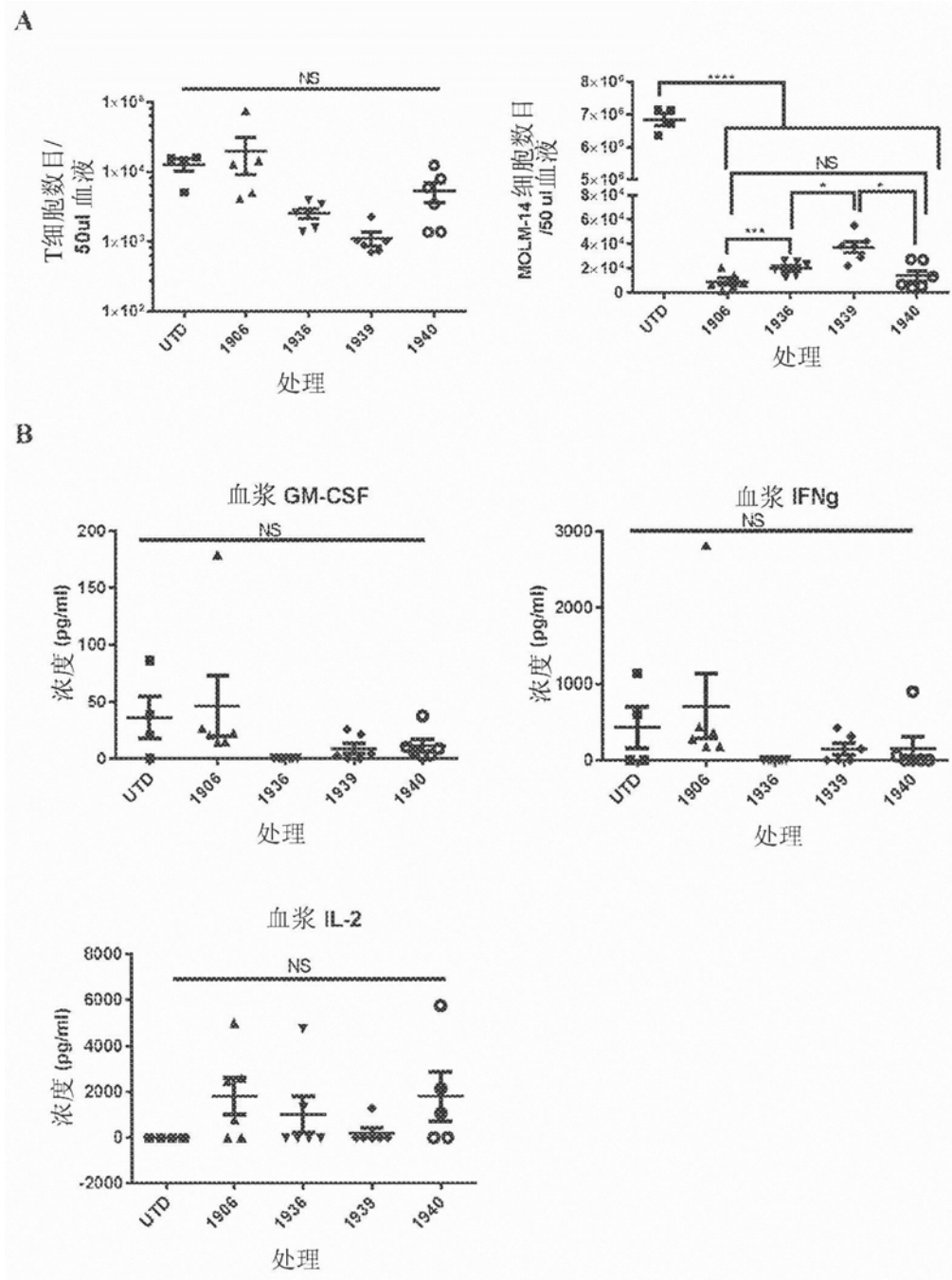


图11

LTG1927 EF1a CD33\_4 CD8 TM CD28 CD3 ζ核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGC  
GTTTCTGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG  
TACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
TCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGACAAGGGCTT  
GAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGG  
ACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTA  
CTGTGCGAAAAGAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCT  
CCTCAGCGGCCGCGACTACCACTCCTGCACCACGGCCACCTACCCAGCC  
CCCACCATTTGCAAGCCAGCCACTTTCACTGCGCCCCGAAGCGTGTAGACC  
AGCTGCTGGAGGAGCCGTGCATACCCGAGGGCTGGACTTCGCCTGTGACA  
TCTACATCTGGGCCCCATTGGCTGGAACTTGCGGCGTGCTGCTCTTGTCTC  
TGGTCATTACCCTGTACTGCCGGTCGAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCG  
ACTACATGAACATGACTCCTAGAAGGCCCGGACCCACTAGAAAGCACTAC  
CAGCCGTACGCCCCCTCCTCGGGATTTGCGCCGCATACCGGTCCAGAGTGAA  
GTTCAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGC  
TCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCCGGCGGGAAGAATATGACGTGCTGGAC  
AAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAG  
AACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGG  
AAGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGG  
TCATGACGGACTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACG  
ATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGG

LTG1927 EF1a CD33\_4 CD8 TM CD28 CD3 ζ氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY  
GMSWVRQAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLR AEDTATYYCAKENVDWGQGT LVT VSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQ  
PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRS  
KRSRL LHS DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA  
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL  
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

图12A



## LTG\_D0033 EF1a CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28z 核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCGGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGC  
CAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA  
TACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAA  
GAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGTCGGA  
TTCCAAGACATGGAATGCGTGCCCTGCGGCGACCCGCCACCTCCTTACGAGCCGCACTGC  
GCATCGAAGGTCAACCTCGTGAAGATCGCGAGCACCGCGTCCTCACCCCGGGATACTGCT  
CTGGCCGCGCTGATTTGTTCCGCCTTGGCCACCGTGCTTCTGGCCCTGCTGATCCTCTGT  
GTGATCCGGTGAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCGACTACATGAACATGACTCCTAGA  
AGGCCCGGACCCACTAGAAAGCACTACCAGCCGTACGCCCTCCTCGGGATTTCGCCGCA  
TACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGACAG  
AACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTGCGCGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAA  
CGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAGAACCCTCAAGAGGGC  
CTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAG  
GGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCATGACGGAAGTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCCACT  
AAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCGCGG

## LTG\_D0033 EF1a CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_CD28z 氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVR  
QAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAK  
ENVDWGQGTILVTVSSAAAVGFQDMECVPCGDP PPPYEPHCASKVN LVKIASTASSPRDTA  
LAAVICSALATVLLALLILCVIRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA  
YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

图12B

LTG\_D0034 (Efla\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_4-1BBz) 核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG  
ATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGC  
CAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA  
TACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAA  
GAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCACTCGGA  
TTCCAAGACATGGAATGCGTGCCCTGCGGCGACCCGCCACCTCCTTACGAGCCGCACTGC  
GCATCGAAGGTCAACCTCGTGAAGATCGCGAGCACCGCGTCCTCACCCCGGGATACTGCT  
CTGGCCGCGGTGATTTGTTCGCGCTTGGCCACCGTGCTTCTGGCCCTGCTGATCCTCTGT  
GTGATCAAGAGGGGCCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTATGCGGCCC  
GTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGG  
GGATGCGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGA  
CAGAACCGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTGCGCGGGAAGAATATGACGTGCTGGAC  
AAACGGCGCGGCA GAGATCCGGAGATGGGGGGAAGCCGAGGAGGAAGAACCCTCAAGAG  
GGCCTGTACAACGAAGTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATG  
AAGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCAAGACGACTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCC  
ACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCG

LTG\_D0034 (Efla\_CD33\_4 VH TNFRSF19 H\_TM\_4-1BBz) 氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVR  
QAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAK  
ENVDWGQGTLVTVSSAAAVGFQDMECVPCGDP PPPYEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTA  
LAAVICSALATVLLALLILCVIKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQE  
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

图12C

LTG\_D0015 CD33\_4VH CD8 BBz T2A tEGFR 核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGC  
GTTTCTGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG  
TACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
TCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGACAAGGGCTT  
GAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGG  
ACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTA  
CTGTGCGAAAGAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCT  
CCTCAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCC  
CCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCC  
GGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATA  
TCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCG  
TGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATC  
TTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCGAGACGACTCAGGAAGAGGACGG  
ATGCTCGTGCGAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGC  
GTCAAGTTCTACGGTCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAA  
TCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTG  
CTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGC  
GGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGAT  
GGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGA  
AAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATA  
CCTACGATGCCTTGTCATATGCAAGCACTCCCACCCCGGTCTAGAGCTAAA  
CGCTCTGGGTCTGGTGAAGGACGAGGTAGCCTTCTTACGTGCGGAGACGT  
GGAGGAAAACCCAGGACCCCGAGCCAAACGAATGCTGCTGCTTGTTACAA  
GCCTTTTGCTCTGCGAACTCCCCCATCCAGCTTTTCTCCTGATTCCAAGGA  
AGGTTTGCAATGGAATCGGTATAGGGGAGTTTAAGGATTCACCTTAGCATA  
AACGCTACTAATATTAACACTTCAAAAACGTGTACGAGTATAAGTGAGGA  
TCTTCACATTTTGCCGGTTGCATTCCGAGGCGATTATTACCCACACGCC  
ACCGCTTGACCCACAAGAATTGGATATTCTTAAAACCGTTAAAGAAATAA  
CGGGGTTTTTGCTCATTCAAGCGTGGCCAGAAAATCGCACTGACCTCCAT

图12D

GCTTTCGAGAACCTGGAGATTATAAGAGGACGAACTAAGCAGCATGGTCA  
ATTCTCCCTTGCTGTGGTCAGCCTGAACATCACCAGTCTTGGTTTGCGGTC  
CCTCAAGGAAATTTCAAGATGGAGATGTCATCATAAGCGGCAACAAGAATT  
TGTGCTATGCAAATACCATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGCACTTCCGGC  
CAGAAAACCAAGATTATTTCAAATCGGGGTGAGAACAGCTGCAAAGCCA  
CCGGCCAGGTTTGTGTCATGCCTTGTGCTCTCCGGAAGGCTGTTGGGGGCCA  
GAACCCAGGGACTGCGTCAGTTGCAGAAACGTCTCAAGAGGCCGCGAAT  
GCGTTGACAAGTGTAACCTCCTTGAGGGTGAGCCACGAGAGTTTGTGAG  
AACAGCGAGTGTATACAATGTCACCCTGAATGTTTGCCCCAGGCTATGAA  
TATAACCTGCACAGGCCGCGGGCCTGATAACTGCATCCAGTGTGCTCATT  
ACATAGATGGACCTCACTGTGTGAAAACCTGCCCCGGCCGGAGTTATGGGA  
GAAAACAACACTCTGGTGTGGAAATACGCTGATGCAGGCCACGTGTGCCA  
CCTTTGTCACCCGAATTGTACATATGGGTGTACCGGTCCTGGACTTGAAGG  
TTGCCCTACCAATGGCCCTAAAATACCCAGTATCGCAACTGGCATGGTAG  
GCGCTCTTCTCTTGCTCTTGGTAGTTGCTCTCGGCATAGGTCTTTTTATG

图12D (续)

LTG\_ D0015 CD33\_4VH CD8 BBz T2A tEGFR 氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY  
GMSWVRQAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTATYYCAKENVDWGQGT LVT VSSAAAT TTPAPRPPTPAPT IASQ  
PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR  
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY  
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ  
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRS  
RAKRSGSGEGRGSL LTCGDVEENPGPRAKRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLI PR  
KVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDP  
QELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSL  
NITSLGLRSLKEISDGDVHISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENS  
CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREF  
VENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMG  
ENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVG  
ALLLLLVVALGIGLFM

图12D (续)

LTG\_D0016 CD33\_4VH CD8 28z T2A tEGFR 核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGC  
GTTTCTGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG  
TACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
TCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGACAAGGGCTT  
GAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGG  
ACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTA  
CTGTGCGAAAGAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCT  
CCTCAGCGGCCGCGACTACCACTCCTGCACCACGGCCACCTACCCAGCC  
CCCACCATTTGCAAGCCAGCCACTTTCACTGCGCCCCGAAGCGTGTAGACC  
AGCTGCTGGAGGAGCCGTGCATACCCGAGGGCTGGACTTCGCCTGTGACA  
TCTACATCTGGGCCCCATTGGCTGGAACCTTGCGGCGTGCTGCTCTTGTCTC  
TGGTCATTACCCTGTACTGCCGGTCGAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCG  
ACTACATGAACATGACTCCTAGAAGGCCCCGACCCACTAGAAAGCACTAC  
CAGCCGTACGCCCCCTCCTCGGGATTTGCGCCGCATACCGGTCCAGAGTGAA  
GTTCAAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGC  
TCTACAACGAGCTCAACCTGGGTGCGCGGGAAGAATATGACGTGCTGGAC  
AAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAG  
AACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGG  
AAGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGAGAGGGAAGGG  
TCATGACGGACTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACG  
ATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGGAGAGCTAAACGCTCTGGG  
TCTGGTGAAGGACGAGGTAGCCTTCTTACGTGCGGAGACGTGGAGGAAAA  
CCCAGGACCCCGAGCCAAACGAATGCTGCTGCTTGTTACAAGCCTTTTGCT  
CTGCGAACTCCCCCATCCAGCTTTTCTCCTGATTCCAAGGAAGGTTTGCAA  
TGGAATCGGTATAGGGGAGTTTAAGGATTCACTTAGCATAAACGCTACTA  
ATATTAAACACTTCAAAAACGTACGAGTATAAGTGAGATCTTCACATTT  
TGCCGGTTGCATTCCGAGGCGATTCAATCACCCACACGCCACCGCTTGACC  
CACAAGAATTGGATATTCTTAAAACCGTTAAAGAAATAACGGGGTTTTTG  
CTCATTCAAGCGTGGCCAGAAAATCGCACTGACCTCCATGCTTTCGAGAA

图12E



CCTGGAGATTATAAGAGGACGAACTAAGCAGCATGGTCAATTCTCCCTTG  
CTGTGGTCAGCCTGAACATCACCAGTCTTGGTTTGCGGTCCCTCAAGGAA  
ATTTTCAGATGGAGATGTCATCATAAGCGGCAACAAGAATTTGTGCTATGC  
AAATACCATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGCACTTCCGGCCAGAAAAACCA  
AGATTATTTCAAATCGGGGTGAGAACAGCTGCAAAGCCACCGGCCAGGTT  
TGTCATGCCCTTGTGCTCTCCGGAAGGCTGTTGGGGGCCAGAACCCAGGGA  
CTGCGTCAGTTGCAGAAACGTCTCAAGAGGCCGCGAATGCGTTGACAAGT  
GTAACCTCCTTGAGGGTGAGCCACGAGAGTTTGTGAGAACAGCGAGTGT  
ATACAATGTCACCCTGAATGTTTGCCCCAGGCTATGAATATAACCTGCAC  
AGGCCGCGGGCCTGATAACTGCATCCAGTGTGCTCATTACATAGATGGAC  
CTCACTGTGTGAAAACCTGCCCGGCCGAGTTATGGGAGAAAAACAACACT  
CTGGTGTGGAAATACGCTGATGCAGGCCACGTGTGCCACCTTTGTCACCC  
GAATTGTACATATGGGTGTACCGGTCTGGACTTGAAGGTTGCCCTACCA  
ATGGCCCTAAAATACCCAGTATCGCAACTGGCATGGTAGGCGCTCTTCTCT  
TGCTCTTGGTAGTTGCTCTCGGCATAGGTCTTTTTATG

LTG\_D0016 CD33\_4VH CD8 28z T2A tEGFR 氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY  
GMSWVRQAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLR AEDTATYYCAKENVDWGQGT LVT VSSAAATTPAPRPPTPAPTASQ  
PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRS  
KRSRL LHS DYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA  
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL  
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  
RAKRS GSGEGRGSLLTCGDVEENPGPRAKRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLI  
KVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDP  
QELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSL  
NITSLGLRSLKEISDGDVHISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKHSNRGENS  
CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREF  
VENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMG  
ENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVG  
ALLLLLVVALGIGLFM

图12E (续)

LTG\_D0035 (Efla\_CD33\_4 VH H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28z) 核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTC  
TGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG  
GAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGG  
CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGCCAACAT  
AAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCCGATTCAC  
CATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG  
AGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAAGAAAATGTGGACTGGGGCCA  
GGGCACCCTGGTACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAGAGCAAATACGGGGCCGCC  
ATGTCCCCCGTGTCCGGCACCAACAGTTGCTGGCCCTAGTGTCTTCTTGTTCCTC  
CCAAGCCCAAAGACACCTTGATGATTTCCAGAACTCCTGAGGTTACCTGCGTTGT  
CGTAGATGTTTCTCAGGAGGACCCAGAGGTCCAATTTAACTGGTACGTTGATGGG  
GTGGAAGTTCACAATGCGAAGACAAAGCCGCGGGAAGAACAATTTAGTCCACT  
TACCGGGTTGTCAGCGTTCTGACGGTATTGCATCAAGACTGGCTTAATGGAAGG  
AATATAAGTGTAAGGTGTCCAACAAAGGTTTGCCGAGCAGTATTGAGAAGACCA  
TATCAAAGGCCGAAGGGGCAGCCGCGCGAGCCACAAGTTTACACTTTGCCGCCAT  
CTCAAGAGGAAATGACTAAAAACCAGGTATCCTTGACATGCCTCGTAAAAGGAT  
TTTATCCATCTGATATTGCTGTGGAATGGGAGTCTAACGGGCAGCCGGAATAA  
TTACAAAACCTACACCACCTGTGCTCGATTGAGTGAAGTTTCTTCCTTTACAGT  
AGACTTACGGTGGACAAATCTAGGTGGCAGGAAGGGAATGTGTTTAGTTGTAGT  
GTAATGCACGAGGCACTTCATAACCACTATACACAGAAGTCACTGAGTTTGAGTC  
TTGGCAAAATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCT  
GTCACTGGTTATCACCTTTACTGCCGGTTCGAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCC  
GACTACATGAACATGACTCCTAGAAAGGCCCGGACCCACTAGAAAGCACTACCAG  
CCGTACGCCCCCTCCTCGGGATTTGCGCCGATACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCC  
GCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTCTACAACGAGC  
TCAACCTGGGTTCGGCGGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAACGGCGCGGCAGAG  
ATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTAC  
AACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATGAA  
GGGAGAACGCGGAGAGGGAAGGGTCATGACGGACTGTACCAGGGCCTGTCAA  
CTGCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGG

图12F



LTG\_D0035 (Efla\_CD33\_4 VII H CH2 CH3 IgG4\_CD8TM\_CD28z) 氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSY  
GMSWVRQAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTATYYCAKENVDWGQGT LVT VSSAAAESKYGPPCPPCPAPPVA  
GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS  
LGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH  
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD  
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

图12F (续)